

**IRF-1 regulierte Gene:  
Ihre Bedeutung bei der Tumorsuppression  
und der Abwehr viraler Infektionen**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Anja Stirnweiß  
aus Magdeburg

1. Referent:	Dr. Gerhard Gross
2. Referent:	Prof. Dr. Dieter Jahn
eingereicht am:	25.07.2007
mündliche Prüfung (Disputation) am:	09.11.2007
Druckjahr:	2007

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikationen**

Kröger, A., Stirnweiss, A., Pulverer, J. E., Klages, K., Grashoff, M., Reimann, J., and Hauser, H.: Tumor Suppression by IFN Regulatory Factor-1 Is Mediated by Transcriptional Down-regulation of Cyclin D1. *Cancer Res* 67, 2972-2981 (2007).

### **Tagungsbeiträge**

Wiese, A., Klages, K., Hauser, H., and Kröger, A.: Induction of the antiviral protein Viperin by interferon and virus depends on Interferon Regulatory Factor 1. (Poster) 6<sup>th</sup> International Cytokine Conference, Wien. Sonderheft : *Eur Cytokine Netw* 17, *Eur Cytokine Netw* 17, 123 (2006).

Wiese, A., Hauser, H., and Kröger, A.: IRF-1 restores the expression of c-myc, c-H-ras transformed NIH3T3. (Poster) Summer School Molecular Interactions during Infection, Quedlinburg (2006).

Kröger, A., Wiese, A., Klages, K., and Hauser, H.: Tumor suppression by Interferon Regulatory Factor-1 relies on down-regulation of Cyclin D1. (Vortrag) 6<sup>th</sup> International Cytokine Conference, Wien. Sonderheft: *Eur Cytokine Netw* 17, 94-95 (2006).

Kröger, A., Wiese, A., Klages, K., and Hauser, H.: Critical role of cyclin D1 for cell cycle regulation and tumorigenic growth, and its regulation by the tumor suppressor IRF-1. (Poster) Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie, Braunschweig Sonderheft: *EJBC* 85, 86-87 (2006).

# I. Inhaltsverzeichnis

<b>I. Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>II. Zusammenfassung.....</b>	<b>VI</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1. Die „Interferon Regulatory Factor“ Familie .....	1
1.1.1. Der „Interferon Regulatory Factor“-1 (IRF-1).....	2
1.1.1.1. Die antiproliferativen und tumorsuppressiven Effekte von IRF-1.....	2
1.1.1.2. Die immunmodulatorischen Effekte von IRF-1 .....	3
1.1.1.3. Die antiviralen Effekte von IRF-1.....	4
1.2. Der Zellzyklus .....	5
1.2.1. Zykline und Zyklin abhängige Kinasen (CDKs).....	5
1.2.1.1. Bedeutung der G1/S Phase Regulatoren .....	6
1.2.2. Die CDK-Inhibitoren (CKIs) .....	7
1.2.2.1. Der Zellzyklusregulator p27 <sup>Kip1</sup> .....	7
1.3. Die Rolle von Interferonen (IFNs) und Interferon stimulierten Genen (ISGs) bei der Abwehr von Virusinfektionen.....	8
1.3.1. Typ I IFNs – Induktion und Signalweg.....	9
1.3.2. Typ II IFN – Induktion und Signalweg.....	11
1.3.3. Wichtige ISGs mit antiviraler Aktivität .....	12
1.3.3.1. Viperin.....	13
1.4. Aufgabenstellung .....	13
<b>2. Ergebnisse .....</b>	<b>15</b>
2.1. Identifizierung von IRF-1 regulierten Genen.....	15
2.1.1. IRF-1 beeinflusst das Expressionsprofil transformierter Zellen .....	16
2.1.2. IRF-1 revertiert die Expression von Onkogen-deregulierten Genen .....	18
2.1.3. IRF-1 vermittelt transkriptionelle Veränderungen die mit den physiologischen IRF-1 Effekten korrelieren .....	19
2.1.4. Identifizierung direkter IRF-1 Zielgene .....	22
2.2. Charakterisierung der antiproliferativen IRF-1 Effekte .....	25
2.2.1. Die Expression von IRF-1 führt zur Akkumulation transformierter Zellen in der G1 Phase.....	25
2.2.2. IRF-1 reduziert die Zyklin D1 Expression.....	28
2.2.3. IRF-1 inaktiviert den MAPK Signalweg.....	30

2.2.4. IRF-1 inhibiert die CDK4 Aktivität und reduziert die Phosphorylierung von pRB	31
2.2.5. Die Reduktion der endogenen Zyklin D1 Konzentration simuliert die antiproliferativen Effekte von IRF-1 in transformierten Zellen.....	32
2.2.6. IRF-1 verringert Proteinkonzentration und Kinaseaktivität von CDK2 .....	34
2.2.7. Die Reduktion der CDK2 Kinaseaktivität ist unabhängig von der Zyklin D1 Regulation .....	36
2.2.8. Die Aktivierung von IRF-1 führt zur Akkumulation von p27 .....	37
2.2.8.1. IRF-1 hat keinen Einfluss auf die p27 mRNA Konzentration .....	38
2.2.8.2. IRF-1 hat keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisierung von p27 .....	39
2.2.8.3. IRF-1 erhöht die Stabilität des p27 Proteins .....	40
2.2.9. Einfluss von p27 auf die IRF-1 vermittelte Proliferationsinhibition.....	42
2.2.9.1. p27 ist nicht an den antiproliferativen Effekten von IRF-1 beteiligt .....	43
2.2.9.2. Einfluss von p27 auf die IRF-1 vermittelte CDK2 Reduktion.....	44
2.3. Charakterisierung der antiviralen IRF-1 Effekte.....	45
2.3.1. IRF-1 induziert die Expression von Viperin .....	46
2.3.1.1. IRF-1 interagiert mit den IRF-Es des Viperin Promotors .....	47
2.3.1.2. Funktionalität der IRF-Es im Viperin Promotor .....	49
2.3.2. Viperin wird durch Interferone und Viren induziert .....	49
2.3.3. VSV und NDV induzieren Viperin Typ I IFN unabhängig .....	50
2.3.4. Die Induktion der Viperin Expression nach VSV Infektion ist IRF-1 abhängig ...	51
2.3.5. IRF-1 induziert die Viperin mRNA Typ I IFN unabhängig.....	53
2.3.6. Viperin inhibiert die VSV Replikation.....	54
<b>3. Diskussion .....</b>	<b>56</b>
3.1. IRF-1 regulierte Gene.....	56
3.2. Antiproliferative und tumorsuppressive IRF-1 Effekte .....	58
3.2.1. Zyklin D1 unabhängige IRF-1 Effekte.....	61
3.3. Antivirale IRF-1 Effekte .....	63
<b>4. Material und Methoden .....</b>	<b>67</b>
4.1. Geräte .....	67
4.2. Materialien .....	69
4.3. Sterilisation.....	69
4.3.1. Sterilisation durch Hitze.....	69
4.3.2. Sterilisation durch Filtration.....	69

4.4. Arbeiten mit E.coli .....	70
4.4.1. Verwendete Stämme .....	70
4.4.2. Kulturmedien für Bakterien .....	70
4.4.3. Herstellung von Agarplatten .....	70
4.4.4. Herstellung elektrokompenter Bakterien.....	70
4.4.5. Elektrotransformation kompetenter Bakterien .....	71
4.4.6. Konservierung von Bakterien.....	71
4.5. Arbeiten mit eukaryontischen Zelllinien.....	71
4.5.1. Verwendete Zelllinien und Viren.....	71
4.5.2. Grundmedien und Medienzusätze.....	72
4.5.3. Kulturmedien.....	73
4.5.4. Kultivierung von Säugerzellen.....	73
4.5.5. Zellzahlbestimmung .....	74
4.5.6. Langzeitlagerung von Säugerzellen .....	74
4.5.7. Bestimmung der Proliferation .....	74
4.5.8. Formation von Weichagar-Kolonien.....	75
4.5.9. Infektion von Zellen .....	75
4.5.10. Virustiterbestimmung.....	75
4.6. Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren.....	76
4.6.1. Isolierung von Gesamt-RNA.....	76
4.6.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien im analytischen Maßstab.....	76
4.6.3. Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab (Quiagen).....	77
4.6.4. Agarose-Gelelektrophorese .....	77
4.6.5. Isolierung von DNA aus Agarosegelen (QIAquick-Kit, Quiagen) .....	78
4.6.6. Fällung von DNA .....	78
4.7. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	78
4.7.1.1. Photometrische Bestimmung.....	78
4.8. Modifizierung von DNA .....	79
4.8.1. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen.....	79
4.8.2. Auffüllen von 5'-überstehenden Enden .....	79
4.8.3. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	79
4.8.4. Ligation von DNA-Fragmenten .....	80
4.8.5. Gerichtete <i>in-vitro</i> Mutagenese.....	80
4.9. Charakterisierung von Nukleinsäuren.....	81

4.9.1. Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	81
4.9.2. RT PCR .....	82
4.9.3. Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) .....	83
4.9.4. Sequenzierung von DNA .....	83
4.10. Gentransfermethoden .....	83
4.10.1. Transfektion mittels Calciumphosphat/DNA Präzipitation .....	83
4.10.2. Transfektion mittels Metafectene .....	84
4.10.3. Retrovirale Infektion .....	84
4.10.4. Durchführung einer Selektion .....	84
4.11. Durchflusszytofluorimetrie (FACS).....	85
4.11.1. Bestimmung der Infektionseffizienz .....	85
4.11.2. Zellzyklusanalyse .....	85
4.11.3. BrdU-Färbung .....	86
4.12. Proteinanalytik .....	86
4.12.1. Zellaufschluss.....	86
4.12.2. Proteinbestimmung (BCA-Assay).....	87
4.12.3. Polyacrylamid Gelelektrophorese .....	87
4.12.4. Western Blot.....	88
4.12.5. Immunpräzipitation .....	90
4.12.6. Kinaseaktivitätstests für CDK2 und CDK4 (Wolf et al., 2003, modifiziert) .....	91
CDK2 91	
4.12.7. <i>In vitro</i> – Translation mit Retikulozyten-Lysat aus Kaninchen .....	92
4.12.8. „Electrophoretic obility shift assay” (EMSA).....	93
4.12.9. Bestimmung der Luciferase-Aktivität .....	94
4.12.10. In-vitro Imaging von endogenem p27 mittels Immunfluoreszenz .....	94
4.12.11. Bestimmung von Interferon .....	95
4.13. Genexpressionsanalyse.....	95
4.13.1. Synthese der markierten RNA.....	95
4.13.2. Hybridisierung der cRNA mit den „DNA-Microarray-Chips“ .....	96
4.13.3. Datenanalyse der „DNA-Microarrays“ .....	96
4.13.4. “Gene Ontology” Analyse.....	97
4.13.5. “Clusteranalysen” .....	97
4.14. Antikörper .....	98
4.14.1. Primäre Antikörper.....	98

---

4.14.2. sekundäre Antikörper .....	98
4.15. Primer .....	99
4.16. Vektoren .....	100
4.16.1. Verwendete Vektoren.....	100
4.16.2. Hergestellte Vektoren.....	101
<b>5. Abkürzungen .....</b>	<b>104</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>109</b>
<b>7. Anhang .....</b>	<b>124</b>



## II. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Frage wie der Transkriptionsfaktor IRF-1 in Zellen antivirale und antiproliferative/tumorsuppressive Aktivitäten auslösen kann. Die Effekte wurden in einem Zellkulturmodell untersucht, indem sowohl die onkogene Transformation als auch die die IRF-1 Aktivität von außen gesteuert werden kann. Dies entspricht in idealisierter Form der natürlichen Situation, in der IRF-1 durch Pathogene und proinflammatorische Zytokine transkriptionell induziert wird. Durch Genexpressionsanalysen dieser Zellen in verschiedenen Zuständen konnten 83 Gene als direkt regulierte IRF-1 Zielgene identifiziert werden, während die Transkription von 1630 Genen als indirekte Folge der IRF-1 Aktivität verändert wird.

Simultan mit der tumorsuppressorischen Wirkung von IRF-1 konnte eine Reversion der Expression von 60 % aller Gene festgestellt werden, die beim Übergang von normalen zu onkogene transformierten Zellen dereguliert werden. Diese gehören zu den indirekt regulierten Genen. Viele der IRF-1 regulierten Gene kodieren für Proteine, die an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind. Anhand theoretischer Überlegungen wurden einige davon ausgewählt und in funktionalen Untersuchungen überprüft. Es wurde nachgewiesen, dass die IRF-1 vermittelte Reversion fast uneingeschränkt auf eine Normalisierung der erhöhten Zyklin D1 Expression zurückzuführen ist. CDK2 wurde als weiteres Ziel einer IRF-1 induzierten potentiell antitumoralen Aktivität identifiziert. Die IRF-1 vermittelte Reduktion der CDK2 Kinaseaktivität spielt im vorliegenden Zellkulturmodell allerdings nur eine untergeordnete Rolle.

Unter den Genprodukten der direkten IRF-1 Zielgene sind solche, von denen bekannt ist, dass sie bei der Abwehr von Pathogenen mitwirken. Eines dieser Gene ist Viperin, das bisher als ein Interferon stimuliertes Gen (ISG) mit antiviraler Aktivität beschrieben wurde. Für die Klärung der Frage, welche Rolle IRF-1 bei der Induktion von Viperin nach Infektion spielt, wurden Infektionsversuche mit VSV (Vesikular Stomatitis Virus) durchgeführt. VSV hemmt die Aktivierung des Interferon Systems äußerst effizient. Die Ergebnisse zeigen, dass das Viperin Gen IRF-1 abhängig von Viren induziert wird und sein Genprodukt die VSV Replikation effektiv hemmt. Weiterhin wurde gezeigt, dass IRF-1 einen eigenen IFN unabhängigen, antiviralen Schutz vermittelt. Da auch andere antivirale Gene durch IRF-1 induziert werden, wird gefolgert, dass IRF-1 für die Etablierung antiviraler Mechanismen essentiell ist, wenn das Interferon System durch die Virusinfektion inhibiert wird.

## 1. Einleitung

### 1.1. Die „Interferon Regulatory Factor“ Familie

Die „Interferon Regulatory Factor“ (IRF) Familie ist eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die ihren Namen in Anlehnung an die Funktion ihres ersten Mitgliedes erhalten haben. IRF-1 wurde durch seine Fähigkeit entdeckt, an positiv regulierende Sequenzen (PRDI+III) des IFN- $\beta$  Promotors zu binden (Fujita et al., 1988). Ähnliche Sequenzmotive wurden auch in den Promotoren IFN regulierter Gene (ISGs) gefunden und „IFN-Stimulated Response Element“ (ISRE) genannt. Die IRF-Familie besteht derzeit aus zehn Mitgliedern (IRF-1 bis IRF-7, IRF-8/ICSBP, IRF-9/p48 und IRF-10). Ihnen allen gemein ist eine hoch konservierte Aminosäuresequenz im N-terminalen Bereich, der die DNA-Bindedomäne enthält (Mamane et al., 1999; Nehyba et al., 2002). Auf Grund dieser hohen Homologie binden alle IRFs an annähernd identische DNA-Motive (IRF-Es, ISREs und PRDs). Trotzdem regulieren die einzelnen IRF-Mitglieder nicht dasselbe Repertoire an Genen. Diese Unterschiede in der Spezifität der IRFs hängen mit der Interaktion weiterer Bindungspartner zusammen. IRF-9 (p48) kann beispielsweise nur dann als Transkriptionsfaktor funktionieren, wenn es zusammen mit STAT1 und STAT2 den ISGF3 genannten Komplex ausbildet. Über IRF-9 bindet der ISGF3 Komplex an ISRE-Motive auf der zellulären DNA und induziert auf diese Weise die Transkription von ISGs (Levy et al., 1988). Viele Mitglieder der IRF-Familie besitzen im C-terminus eine „IRF Association Domain“ (IAD), über die eine Interaktion mit anderen IRFs möglich wird (Nehyba et al., 2002; Tanaka and Taniguchi, 2000). IRF-3 und IRF-7 bilden Homo- und Heterodimere aus, die für die transkriptionelle Induktion der IFN- $\alpha/\beta$  Gene verantwortlich sind. Alle Gene der IFN- $\alpha$  Subfamilie, mit Ausnahme von IFN- $\alpha 4$ , werden durch IRF-7 Homodimere induziert. Die Expression des IFN- $\beta$  Gens wird durch IRF-3 bzw. IRF-7 Homodimere, aber auch durch IRF-3/IRF-7 Heterodimere aktiviert (Marie et al., 1998; Sato et al., 1998; Sato et al., 2000). Bevor die transkriptionelle Induktion der jeweiligen Gene stattfinden kann, muss das Dimer an einen seiner beiden Koaktivatoren (CBP oder p300) binden und gemeinsam mit NF- $\kappa$ B das so genannte „Enhanceosomen“ ausbilden (Lenardo et al., 1989; Taniguchi et al., 2001; Wathelet et al., 1998).

Phylogenetische Analysen zeigen, dass die IRF-Familie in der Vertebratenevolution schon sehr früh durch Duplikation und Diversifikation entstanden ist. Vier der Subfamilienmitglieder wurden bereits im Knochenfisch gefunden, wobei das Auftreten der meisten IRFs mit der

Entwicklung des adaptiven Immunsystems in der entsprechenden Spezies korreliert (Nehyba et al., 2002).

### **1.1.1. Der „Interferon Regulatory Factor“-1 (IRF-1)**

IRF-1, ein multifunktionales Mitglied der IRF-Familie, ist in verschiedene zelluläre Prozesse wie Zellwachstum, Pathogenabwehr, Immunmodulation und Entzündungsreaktionen involviert und wird in fast allen Zellen in geringen Mengen konstitutiv exprimiert (Kröger et al., 2002). Eine Vielzahl von Zytokinen wie IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, LIF und TNF $\alpha$ , aber auch Viren sind in der Lage die IRF-1 Expression zu induzieren (Abdollahi et al., 1991; Fujita et al., 1989; Watanabe et al., 1991). STAT1 ist für diese Induktion essentiell. Demzufolge kommt es in STAT1 defizienten Zellen nicht mehr zum Anstieg der IRF-1 mRNA Konzentration, wenn sie durch IFN stimuliert werden (Durbin et al., 1996; Meraz et al., 1996). Zusammen mit NF- $\kappa$ B induzieren STAT1 Homodimere (GAF) die Aktivität des IRF-1 Promotors und steigern auf diese Weise die IRF-1 Transkription (Harada et al., 1994; Pine et al., 1994).

Für die transkriptionelle Aktivierung seiner eigenen Zielgene bindet IRF-1 an IRF-E Motive mit der Konsensussequenz G(A)AAA<sup>G</sup>/<sub>C</sub><sup>T</sup>/C GAAA<sup>G</sup>/<sub>C</sub><sup>T</sup>/C (Tanaka et al., 1993). Durch die hohe Ähnlichkeit mit der ISRE Konsensussequenz <sup>A</sup>/<sub>G</sub>NGAAANNGAAACT (Tanaka and Taniguchi, 2000), gibt es Überlappungen zwischen ISGF3 regulierten Genen und den direkten IRF-1 Zielgenen. In den meisten Fällen bindet IRF-1 als Monomer an die Promotorelemente (Escalante et al., 1998), es gibt aber auch Beispiele für Interaktionen mit anderen Proteinen. Es handelt sich dabei sehr oft um synergistische Effekte, wie bei der IRF-1 und NF- $\kappa$ B vermittelten Geninduktion der MHC Klasse I Moleküle (Drew et al., 1995; Ten et al., 1993).

#### **1.1.1.1. Die antiproliferativen und tumorsuppressiven Effekte von IRF-1**

In seiner Funktion als Transkriptionsfaktor induziert IRF-1 eine Reihe von Zellzyklus-regulierenden Genen, darunter PKR (double-stranded (ds)RNA Protein Kinase), eine Serin/Threonin Kinase mit antiviralen und antiproliferativen Eigenschaften (Haines et al., 1991; Koromilas et al., 1992). Mit Hilfe einer katalytisch inaktiven, dominant negativen PKR Mutante konnte gezeigt werden, dass IRF-1 seine Proliferations-inhibitorische Wirkung unter anderem durch die Induktion von PKR vermittelt (Kirchhoff et al., 1995). Des Weiteren aktiviert IRF-1 zusammen mit p53 die Transkription des Zellzyklusinhibitors p21 (WAF1/CIP1) (Tanaka et al., 1996). Der antiproliferative Einfluss von IRF-1 konnte in primären, immortalisierten und transformierten Zellen nachgewiesen werden (Kirchhoff et al.,

1995; Kirchhoff et al., 1996; Kröger et al., 2001; Yamada et al., 1991). Es zeigte sich jedoch, dass die IRF-1 vermittelte Proliferationsinhibition in transformierten Zellen wesentlich stärker ausgeprägt ist, als in nicht-transformierten Zellen (Kröger et al., 2003). Die Überexpression von IRF-1 inhibiert jedoch nicht nur die Proliferation von transformierten Zellen, sie bewirkt auch eine Reversion des transformierten Phänotyps (Kröger et al., 2003; Kröger et al., 2001; Tanaka et al., 1994b).

Studien mit IRF-1 defizienten Fibroblasten (IRF-1<sup>-/-</sup>) führten zu der Erkenntnis, dass es sich bei IRF-1 um einen Tumorsuppressor handeln muss. Obwohl die Transformation von primären Mausfibroblasten normalerweise zweier Onkogene bedarf, reicht die Überexpression eines einzigen Onkogenes (c-H-ras) aus, um die IRF-1 defizienten Zellen zu transformieren (Tanaka et al., 1994a). IRF-1<sup>-/-</sup> Mäuse besitzen zwar keine Prädisposition zur Ausbildung von spontanen Tumoren (Nozawa et al., 1999), die Überexpression des Onkogens c-H-ras führt jedoch in den IRF-1 defizienten Mäusen viel früher zur Tumorbildung als in entsprechenden w.t. Mäusen (Nozawa et al., 1999). Klinische Studien zeigen, dass der Verlust von IRF-1 auch bei der Entstehung humaner Tumoren von Bedeutung ist. So korreliert das Auftreten von proleukämischer Myelodysplasie (MDS), Leukämien, Magenkarzinomen und Speiseröhrenkarzinomen mit der Deletion oder Translokation eines oder beider IRF-1 Allele (Itoh et al., 1991; Ogasawara et al., 1996; Tamura et al., 1996; Willman et al., 1993).

#### **1.1.1.2. Die immunmodulatorischen Effekte von IRF-1**

Durch die Analyse von IRF-1 defizienten (IRF-1<sup>-/-</sup>) Mäusen konnten wichtige Informationen über die physiologischen Funktionen von IRF-1 gewonnen werden. Diese Mäuse weisen zwar keine anatomischen Abnormalitäten auf, aber sie besitzen deutliche Defekte in der Entwicklung von Immunzellen (Matsuyama et al., 1993; Ogasawara et al., 1998). CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus IRF-1<sup>-/-</sup> Mäusen exprimieren weniger TAP-1 (Transporter associated with Antigen Processing-1), LMP-2 (Low Molecular weight Protein-2) und MHC Klasse I Proteine als entsprechende Zellen aus w.t. Mäusen. Mittlerweile ist bekannt, dass die Expression von TAP-1 und LMP-2 über einen gemeinsamen, IRF-1 regulierten Promotor induziert wird (White et al., 1996). Da beide Proteine für die Beladung der MHC Klasse I Moleküle verantwortlich sind, ist die CD8<sup>+</sup> Selektion im Thymus und damit auch die Reifung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den IRF-1<sup>-/-</sup> Mäusen gestört (Penninger et al., 1997).

Die Reifung der CD4<sup>+</sup> T Zellen verläuft in den IRF-1<sup>-/-</sup> Mäusen normal. Es ist jedoch auffällig, dass nur sehr wenige der gebildeten CD4<sup>+</sup> Zellen in T-Helferzellen des Typ 1 (Th1) ausdifferenzieren. Dieser Effekt beruht vor allem auf der gestörten IL-12 Produktion durch

Makrophagen (Taki et al., 1997). IRF-1 ist nämlich für die LPS und IFN- $\gamma$  induzierte Expression der IL12 Untereinheiten p35 und p40, aber auch für die transkriptionelle Induktion der IL12-Rezeptor Gene verantwortlich (Liu et al., 2003; Salkowski et al., 1999; Salkowski et al., 2000). Da IL-12 für die Th1 Differenzierung essentiell ist (Magrath et al., 1996), besitzen IRF-1<sup>-/-</sup> Mäuse überwiegend T-Helferzellen des Typs 2 (Th2). Die Expression der Inducible Nitric Oxide Synthetase (iNOS) erfolgt in Makrophagen nach IFN- $\gamma$  oder LPS Stimulation und ist ebenfalls IRF-1 abhängig (Kamijo et al., 1994). iNOS katalysiert die Umwandlung von L-Arginin in L-Zitrullin. Das bei der Reaktion frei werdende Stickstoffmonoxid ist ein hoch reaktives Gas, welches für die Abwehr von Bakterien, Pilzen und Protozoen essentiell ist (Martin et al., 1994). Eine Vielzahl von Viren reagiert ebenfalls sensitiv auf NO. Bei Coxsackieviren des Typ 3B (CVB3) und Japanese Encephalitis Viren (JEV) wird die RNA Synthese und die Proteinsynthese durch NO inhibiert (Lin et al., 1997; Zaragoza et al., 1997). NO trägt auch zur Abwehr von Vaccinia Viren bei, da es die DNA Replikation und die Synthese später Virus-Proteine inhibiert (Harris et al., 1995).

#### **1.1.1.3. Die antiviralen Effekte von IRF-1**

Neben iNOS induziert IRF-1 weitere Gene deren Genprodukte antivirale Aktivität besitzt, dazu gehören 2'-5'-OAS (2'-5'-oligoadenylate Synthetasen), PKR und die GBPs (Guanylate Binding Protein). Die durch dsRNA aktivierte 2'-5'-OAS synthetisiert 2'-5'-Oligoadenylate mit einer Länge von 2-10 Nukleotiden (Kerr and Brown, 1978), welche ihrerseits die latent im Zytoplasma vorkommende RNaseL (Ribonuklease L) aktivieren. Anschließend werden die viralen RNAs, aber auch zelluläre mRNAs durch das Enzym degradiert (De Benedetti and Baglioni, 1984; Slattery et al., 1979). PKR ist eine Protein Kinase, die den Translations-Initiations-Faktor eIF2a phosphoryliert nachdem sie durch dsRNA aktiviert wurde. Der daraus resultierende Mangel an eIF2a-GTP verhindert die Anlagerung der Initiator-tRNA an die ribosomale 40-S Untereinheit und es kommt zum Abbruch der Translation (Roberts et al., 1976; Zilberstein et al., 1976). Die antivirale Wirkung der GBPs konnte zwar für verschiedene Viren wie VSV und das EMCV nachgewiesen werden (Anderson et al., 1999), der Wirkmechanismus ist jedoch unbekannt.

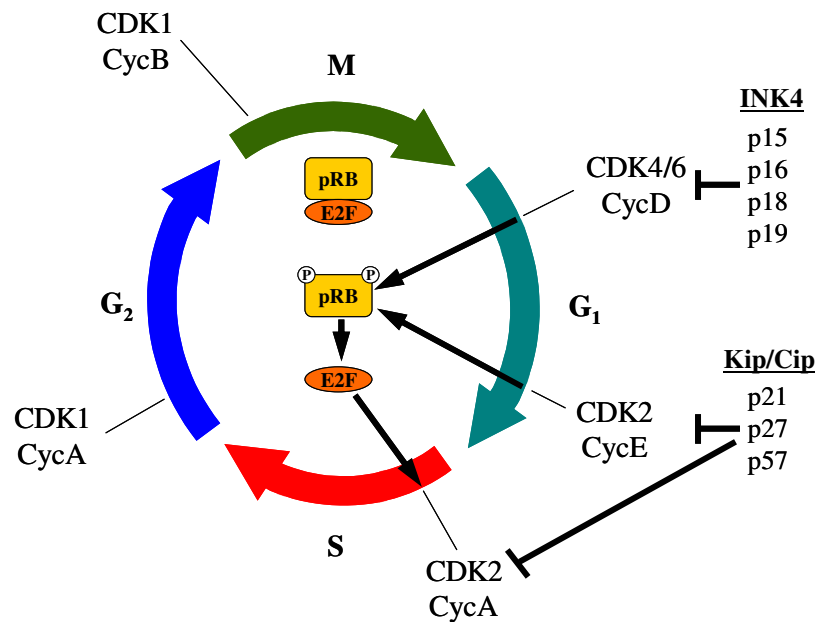
Dass die IRF-1 vermittelte Expression antiviraler Gene zur Abwehr viraler Infektionen beiträgt zeigen in vivo Versuche, in denen die Überexpression von IRF-1 die Virusresistenz gegen VSV, NDV und EMCV erhöht (Pine, 1992). Außerdem sterben IRF-1<sup>-/-</sup> Mäuse sehr viel früher an EMCV Infektionen als die entsprechenden w.t. Mäuse (Kimura et al., 1994). Trotz dieser Erkenntnisse ist bisher wenig über die antiviralen Effekte von IRF-1 bekannt.

## 1.2. Der Zellzyklus

Der eukaryotische Zellzyklus lässt sich in vier Phasen aufteilen, wobei jede Zellzyklusphase durch die Aktivität bestimmter Komplexe gekennzeichnet ist, welche aus einem Zyklin und der dazugehörigen Zyklin abhängigen Kinase (CDK) bestehen (Abb.1). Die Expression der Zykline oszilliert im Verlauf des Zellzyklus, im Gegensatz dazu erfolgt die Expression der CDKs kontinuierlich. Alle CDKs sind ohne ihre regulatorische Untereinheit katalytisch inaktiv. Erst die Bindung des Zyklin aktiviert die Kinasen und verleiht ihnen Substratspezifität. Eine weitere Optimierung der Kinaseaktivität erfolgt durch die CDK Activating Kinase (CAK) Komplex vermittelte Phosphorylierung der Aktivierungsdomäne.

### 1.2.1. Zykline und Zyklin abhängige Kinasen (CDKs)

Normale Zellen brauchen mitogene Wachstumssignale in ihrer Umgebung, um die Zellproliferation zu initiieren. Diese Signale werden durch Transmembranrezeptoren, in die Zelle weitergeleitet und führen zur Aktivierung verschiedener Signalkaskaden. Infolgedessen induzieren Transkriptionsfaktoren wie AP-1, NF- $\kappa$ B oder c-myc die Transkription von Zyklin D1, D2 und D3 (Aktas et al., 1997; Grandori et al., 2000; Joyce et al., 1999; Westwick et al., 1997). Die D-Zykline bilden mit CDK4 oder CDK6 einen Komplex aus, dessen Substrat das Retinoblastomprotein (pRB) ist. Durch die partielle Phosphorylierung von pRB kommt es zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F (Abb.1). Dieser stimuliert unter anderem die Expression von Zyklin E, welches mit der Kinase CDK2 assoziiert. Anschließend hyperphosphorylieren die ZyklinE/CDK2 Komplexe pRB, wodurch es zur vollständigen Freisetzung von E2F kommt. Nun erfolgt die Transkription weiterer E2F-regulierter Gene, welche für den Übergang von der G1 zur S Phase essentiell sind. In der frühen S Phase bewirkt der ZyklinA/CDK2 Komplex die Initiation der DNA-Replikation. Erst in der späten S Phase und in der G2 Phase tritt Zyklin A im Komplex mit CDK1 auf. Es wird vermutet, dass Zyklin A die Komplexbildung von CDK1 und Zyklin B katalysiert und dazu CDK1 kurzfristig bindet (Pagano et al., 1992). Bis zum Ende der G2 Phase werden die ZyklinB/CDK1 Komplexe durch inhibitorische Phosphorylierungen von CDK1 inaktiv gehalten (Kishimoto and Okumura, 1997). Mit der Aktivierung des ZyklinB/CDK1 Komplexes erfolgt der Übergang in die M Phase (Jackman and Pines, 1997).



**Abb.1 Der eukaryotische Zellzyklus (Funk and Kind, 1997, abgeändert)**

Der eukaryotische Zellzyklus wird in vier Phasen (G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> und M) unterteilt. Jede Zellzyklusphase ist durch das Auftreten spezifischer Zyklin/CDK Komplexe (Cyc/CDK) gekennzeichnet, deren Aktivität durch Inhibitoren der INK4- und der Kip/Cip-Familie kontrolliert wird. In der G<sub>1</sub> Phase phosphorylieren sowohl die CycD/CDK4(6) Komplexe als auch die CycE/CDK2 Komplexe das Retinoblastenprotein (pRB), wodurch es zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F kommt. Die Expression der E2F regulierten Gene ist für den Übergang von der G<sub>1</sub> Phase in die S Phase essentiell.

### 1.2.1.1. Bedeutung der G<sub>1</sub>/S Phase Regulatoren

Der korrekte Ablauf des Zellzyklus ist für die Erhaltung der genetischen Stabilität einer Zelle essentiell. Molekulare Analysen humaner Tumore haben gezeigt, dass Regulatoren des Zellzyklus sehr häufig mutiert sind oder ihre Expression verändert ist. Regulatoren der G<sub>1</sub> und S Phase sind besonders häufig betroffen (Malumbres and Barbacid, 2001). Diese Tumor-assoziierten Veränderungen resultieren meistens aus Genamplifikationen, Translokationen oder epigenetischen Effekten. Sie führen zur Überexpression von Zyklinen (Zykin D1, E1) und CDKs (CDK4, CDK6), aber auch zum Verlust von Zellzyklusinhibitoren (p15, p16, p27). Bei über 50% der untersuchten Brusttumore konnte eine Überexpression von Zyklin D1 nachgewiesen werden (Hall and Peters, 1996). Im Mausmodell führt die erzwungene Überexpression von Zyklin D1 zum unkontrollierten Wachstum der Epidermis, zur Vergrößerung (Hyperplasie) einzelner Organe und zur Entstehung von Karzinomen (Robles et al., 1996; Wang et al., 1994). Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass erhöhte Zyklin D1 Konzentrationen auch zur Entstehung humaner Tumore beitragen. Genetische oder epigenetische Veränderungen von CDK2 konnten in humanen Tumoren nur sehr selten nachgewiesen werden. Allerdings exprimieren die Zellen von über 50% aller untersuchten

humanen Tumore kein oder nur verringerte Mengen des CDK2 Inhibitors p27, was mit einer sehr schlechten Prognose der Patienten korreliert.

Ein weiterer Zellzyklusinhibitor, dessen Verlust zur Entstehung von humanen Tumoren führen kann, ist p16 (INK4A). Der Verlust von p16 erhöht bei Mäusen die Prädisposition zur Ausbildung von Neoplasien und Melanomen (Krimpenfort et al., 2001; Sharpless et al., 2001).

### 1.2.2. Die CDK-Inhibitoren (CKIs)

CDK-Inhibitoren (CKIs) spielen eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Zellzyklus, da sie die Aktivität, die Zusammenlagerung und die Stabilität von Zyklin/CDK Komplexen beeinflussen. Je nach Struktur und Zyklin/CDK Komplex den sie inhibieren werden die CKIs in die INK4- (Inhibitor of CDK4) und die Cip/Kip- Familie unterteilt. Derzeit besteht die INK4-Familie aus vier Mitgliedern: p16<sup>INK4a</sup>; p15<sup>INK4b</sup>; p18<sup>INK4c</sup> und p19<sup>INK4d</sup>. Sie binden an die katalytischen Untereinheiten der Zyklin D Komplexe (CDK4 bzw. CDK6) und verhindern so deren Assoziation mit den D-Zyklinen (Sherr, 1996). Die Cip/Kip Familie umfasst drei Mitglieder: p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> und p57<sup>Kip2</sup>. Alle drei Proteine binden bevorzugt an Zyklin/CDK Komplexe, sind aber auch in der Lage mit einzelnen Zyklinen und CDKs zu interagieren. Die Bindung und Inhibierung der Zyklin/CDK Komplexe erfolgt mit Hilfe einer hoch konservierten, 65 Aminosäuren langen N-terminalen Domäne.

#### 1.2.2.1. Der Zellzyklusregulator p27<sup>Kip1</sup>

Um den korrekten Ablauf der einzelnen Zellzyklusphasen und die Erhaltung der genetischen Stabilität sicherzustellen, verfügt die Zelle über mehrere Zellzyklus-Kontrollpunkte (Weinert, 1997). Antiproliferative Signale, wie der Entzug von Wachstumsfaktoren, verhindern das Passieren des G1 Kontrollpunkts und damit den Eintritt in die S-Phase. Dazu müssen die ZyklinE/CDK2 Komplexe durch den Zellzyklusregulator p27 inhibiert werden (LaBaer et al., 1997). Über einen sterischen Effekt verhindert p27 die Substratbindung und die für die Aktivierung von CDK2 notwendige Phosphorylierung durch den CAK Komplex (Russo et al., 1996). Außerdem kommt es zu Konformationsänderungen in der ATP-Bindedomäne, wodurch die Bindung des für die Phosphorylierung der CDK2 Substrate benötigten ATPs behindert wird (Russo et al., 1996).

Der Phosphorylierungsstatus des p27 Proteins hat entscheidenden Einfluss auf die Affinität und damit auch auf die Zellzyklus-regulatorische Wirkung von p27. Nicht-phosphoryliertes p27 bindet verstärkt an ZyklinE/CDK2 Komplexe und wirkt als Zellzyklusinhibitor. Tyr88/ Tyr89



phosphoryliertes p27 vermittelt Zellzyklus-stimulierende Effekte. Es besitzt eine erhöhte Affinität zu im Zytoplasma lokalisiertem CDK4 und bewirkt dessen Translokation in den Zellkern (Kardinal et al., 2006).

Bei einer Reihe humaner Tumore konnte eine zytoplasmatische Lokalisierung von p27 nachgewiesen werden (Ciaparrone et al., 1998; Masciullo et al., 1999; Singh et al., 1998). Der Export von p27 ins Zytoplasma führt zur dauerhaften Aufrechterhaltung der ZyklinE/CDK2 Aktivität und damit zur unkontrollierten Proliferation der Tumorzellen. Es zeigte sich, dass die Phosphorylierung von Threonin-157 und Serin-10 für die zytoplasmatische Lokalisierung von p27 verantwortlich ist (Shin et al., 2002; Viglietto et al., 2002a).

Auch die Stabilität des p27 Proteins wird über den Phosphorylierungsstatus reguliert. In proliferierenden Zellen oszilliert die p27 Proteinmenge in Abhängigkeit von der Zellzyklusphase. Dabei wird die höchste p27 Proteinkonzentration während der G1-Phase erreicht. Wenn die Zellen in die S-Phase eintreten nimmt der p27 Proteinlevel stark ab und bleibt bis zum nächsten Eintritt in die G1-Phase konstant (Hengst and Reed, 1996). Diese Abnahme des p27-Proteinspiegels ist unter anderem auf den verstärkten Ubiquitin abhängigen Abbau über 26S-Proteasomen zurückzuführen (Pagano et al., 1995). Hierfür phosphoryliert CDK2 p27 am Threonin 187 und markiert es auf diese Weise für die Ubiquitinierung durch den SCF<sup>SKP2</sup>-Komplex (Bartek and Lukas, 2001; Harper, 2001). Anschließend wird das ubiquitinierte p27 proteosomal abgebaut. Dabei besteht eine Art Gleichgewicht zwischen p27 und CDK2. Hohe Mengen an p27 bewirken eine vollständige Inhibition der CDK2 Kinaseaktivität und eine hohe CDK2 Aktivität führt zum vollständigen Abbau des p27 Proteins (Bartek and Lukas, 2001).

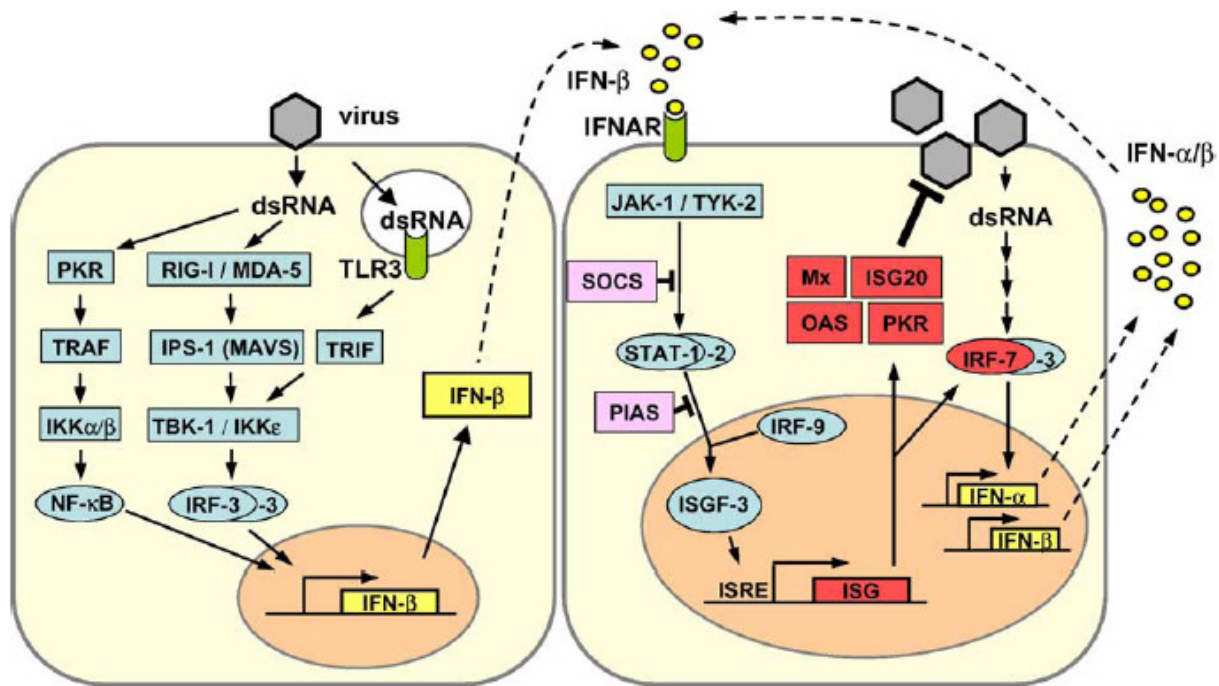
### **1.3. Die Rolle von Interferonen (IFNs) und Interferon stimulierten Genen (ISGs) bei der Abwehr von Virusinfektionen**

Die erste Antwort eines Organismus auf eindringende Pathogene ist die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen. Ziel dieser angeborenen Immunantwort ist es, durch die Induktion antiviraler Gene, die Virusreplikation zu blockieren und eine weitere Ausbreitung der Viren zu verhindern. Die wichtigsten Zytokine, welche infolge viraler Infektion durch die Zellen produziert werden sind die Interferone (IFN). Basierend auf Sequenz Homologien und dem Zelloberflächenrezeptor welchen sie binden und aktivieren werden die Interferone in Typ I, Typ II und Typ III eingeteilt.

Die wichtigsten Mitglieder der Typ I IFN Familie sind IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$ , aber auch IFN- $\delta$ ; - $\epsilon$ ; - $\kappa$ ; - $\tau$  und - $\omega$  gehören dieser IFN Klasse an. Viele Zellen sekretieren Typ I IFNs infolge viraler Infektionen, welche dann autokrin und prakrin den „Interferon-alpha-Rezeptor“ (IFNAR) aktivieren. Da sich die IFNARs auf der Oberfläche jeder Zelle befinden, können die Typ I IFN in allen Zellen einen antiviralen Schutz auslösen. Die Produktion von IFN- $\gamma$ , dem einzigen Mitglied der Typ II IFN Familie, ist auf wenige Zelltypen, wie den CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie den NK Zellen, beschränkt. IFN- $\gamma$  vermittelt eine Reihe immunmodulatorischer Effekte, die sowohl für das angeborene, als auch für das erworbene Immunsystem von Bedeutung sind (Farrar and Schreiber, 1993). Der „Interferon-gamma-Rezeptor“ (IFNGR) befindet genau wie der Typ I IFN Rezeptor auf der Oberfläche der meisten Zelltypen. Somit können fast alle Zellen auf IFN- $\gamma$  reagieren. IL-29 (IFN- $\lambda$ 1) und IL-28A/B (IFN- $\lambda$ 2/3) gehören zur Familie der  $\lambda$  IFNs, welche erst kürzlich definiert wurde (Ank et al., 2006). Sie aktivieren einen Rezeptorkomplex aus der IL-28R Kette, welche spezifisch für diesen Komplex ist, sowie der IL-10R Kette (Kotenko et al., 2003; Sheppard et al., 2003). Die IL-10R Kette ist zudem noch an der Bildung der IL-10, IL-22 und IL-26 Rezeptoren beteiligt (Langer et al., 2004). Bis jetzt konnte die IFN- $\lambda$  Expression nur in Antigen-präsentierenden Zellen (APCs), einigen Krebszelllinien, Hepatozyten und MEFs nachgewiesen werden (Coccia et al., 2004; Kotenko et al., 2003; Onoguchi et al., 2007; Siren et al., 2005).

### 1.3.1. Typ I IFNs – Induktion und Signalweg

Das Erkennen von Pathogenen durch die infizierte Zelle ist die Grundvoraussetzung für eine schnelle und effiziente Immunantwort. Hierfür besitzen Zellen eine Vielzahl von Rezeptoren, die mit den Viruskomponenten interagieren und zelluläre Signalwege aktivieren. Extrazelluläre Rezeptoren wie der Mannose Rezeptor oder TLR4 interagieren mit viralen Oberflächenproteinen (Georgel et al., 2007; Milone and Fitzgerald-Bocarsly, 1998; Yamamoto et al., 2003). Intrazelluläre Rezeptoren detektieren die Komponenten von Viren, die in die Zellen eingedrungen sind. TLR3, TLR7/8 und TLR9 erkennen virale Nukleinsäuren (dsDNA oder ds/ssRNA), die durch die Viruslyse in Endosomen frei werden. Die zytoplasmatischen RNA Helikasen RIG-I und MDA5 sind für die Detektion von viralen Nukleinsäuren essentiell, die ins Zytosol der Zelle gelangt sind (Andrejeva et al., 2004; Yoneyama et al., 2004). In den meisten Fällen führt die Detektion viraler Partikel zur Induktion des so genannten klassischen Typ I IFN Signalwegs (Abb.2). Je nach aktiviertem Rezeptor werden die Transkriptionsfaktoren IRF-3, NF- $\kappa$ B und AP1 über verschiedene Signalkaskaden aktiviert und



**Abb.2 Der „klassische“ Typ I IFN Signalweg (Haller et al., 2006)**

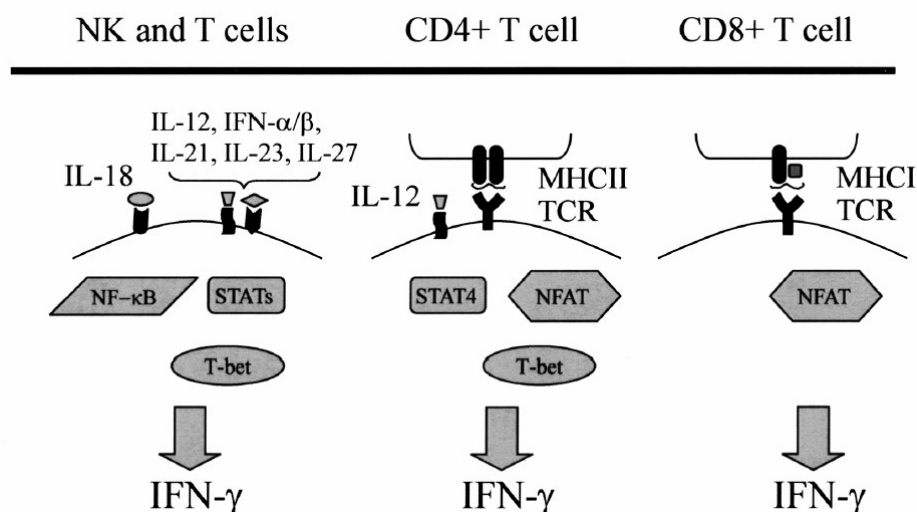
(links) Die Detektion viraler Produkte erfolgt im Zytoplasma durch RIG-I/MDA-5 und im Endosomen durch TLR3. Es kommt zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-κB, IRF-3 und AP1 (nicht eingezeichnet), deren Interaktion zur Expression und Sekretion von IFN-β führt. (rechts) Neu synthetisiertes IFN bindet autokrin oder parakrin an den Typ I IFN Rezeptor (IFNAR) und aktiviert den JAK/STAT Signalweg. Mx, ISG20, OAS, PKR und IRF-7 sind Beispiele für ISGs mit antiviraler Aktivität. IRF-7 vermittelt zusammen mit IRF-3 eine zweite „Welle“ der IFN Produktion in der hauptsächlich IFN-α produziert wird.

Induzieren die Expression von IFN-β. Das sekretierte IFN aktiviert den IFN-α Rezeptor, einem Heterodimer aus IFNAR1 und IFNAR2, wodurch es zur Autophosphorylierung der Rezeptor gebundenen Janus-Kinasen (JAK1 und TYK2) kommt. Anschließend lagern sich STAT1 und STAT2 am Tyrosin-phosphorylierten Rezeptor an und werden durch die Janus Kinasen phosphoryliert. Je ein STAT1 und ein STAT2 Molekül bilden ein ISGF3α genanntes Heterodimer, welches in den Zellkern transportiert wird und mit IRF-9 zum ISGF3 Komplex assoziiert. Dort bindet ISGF3 an die ISRE Motive der ISGs und stimuliert deren Transkription. Auch die Expression von IRF-7, dem stärksten Transkriptionsaktivator der IFN-α Gene, wird auf diese Weise induziert. Über die Induktion von IRF-7 vermitteln die anfangs sekretierten IFNs eine zweite „Welle“ der IFN Produktion in der vorwiegend IFN-α gebildet wird. Im Gegensatz zu anderen Zellen sind plasmazytoide dendritische Zellen (pDC) in der Lage IRF-7 konstitutiv zu exprimieren. Die Induktion der Typ I IFNs erfolgt daher nicht über den klassischen Typ I IFN Signalweg. Die beteiligten TLRs (TLR7/8 und TLR9) sind im Endosomen lokalisiert und werden durch ssRNA bzw. CpG DNA aktiviert. Anschließend wird IRF-7 MyD88 abhängig aktiviert und induziert die Transkription der verschiedenen IFN-α Gene. Die pDCs sekretieren sehr große Mengen der verschiedenen α-IFNs und sind daher die

Hauptproduzenten von IFN. Dementsprechend haben die pDC eine sehr wichtige Rolle bei der Abwehr viraler Infektionen.

### 1.3.2. Typ II IFN – Induktion und Signalweg

IFN- $\gamma$  wurde auf Grund seiner Fähigkeit entdeckt, antivirale Mechanismen in virusinfizierten Zellen zu induzieren. Mittlerweile ist bekannt, dass IFN- $\gamma$  auch an der Abwehr nicht-viraler Pathogene beteiligt ist. IFN- $\gamma$  hat essentielle Funktion bei zahlreichen immunregulatorischen Prozessen, wie dem „B-Zell Switching“ zu bestimmten IgG Klassen und der Entwicklung zu den einzelnen Subtypen von T-Helferzellen. IFN- $\gamma$  gehört zu den Zytokinen und kann durch andere Zytokine oder Antigen präsentierende Zellen (APCs) induziert werden (Abb.3). Unter den Zytokinen ist IL-12 der primäre Induktor von IFN- $\gamma$ . IL12 kann aber auch synergistisch mit anderen Zytokinen, wie IL-18, TNF und IFN- $\alpha/\beta$ , die IFN- $\gamma$  Produktion stimulieren (Malmgaard and Paludan, 2003; Sareneva et al., 1998; Trinchieri et al., 2003). Eine weitere Möglichkeit die IFN- $\gamma$  Expression in den NK- bzw. T-Zellen zu induzieren ist die Stimulation von Zell-Oberflächen-Rezeptoren (Abb.3). Die Interaktion des T Zell Rezeptors (TCR) mit Peptiden, welche von APCs über MHCI oder MHCII Moleküle präsentiert werden, führt zur Aktivierung des Rezeptors. In CD8<sup>+</sup> T Zellen ist diese Aktivierung des TCR ausreichend um die Expression von IFN- $\gamma$  zu induzieren. Bei CD4<sup>+</sup> T Zellen wird wiederum IL-12 als Kostimulator benötigt (Carter and Murphy, 1999). Beispiele für NK Zell-Oberflächen-Rezeptoren und der humane Ig-like Rezeptor DL4 (Arase et al., 1997; Rajagopalan et al., 2001).



**Abb.3 Induktion von IFN- $\gamma$  (Malmgaard, 2004)**

In NK- und T-Zellen induzieren verschiedene Zytokine, alleine oder in Kombination, die Expression von IFN- $\gamma$ . Auch die Aktivierung des T-Zell Rezeptors (TCR) durch MHCI/II-Antigenkomplexe führt zur IFN- $\gamma$  Produktion, allerdings ist in CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine zusätzliche Stimulation durch IL-12 notwendig.

Rezeptoren, deren Aktivierung die IFN- $\gamma$  Produktion stimuliert, sind die murinen Ig und NK1.1. Obwohl IFN- $\gamma$  nur von bestimmten Immunzellen gebildet wird, können fast alle Zellen auf IFN- $\gamma$  reagieren. Der dafür benötigte IFN- $\gamma$  Rezeptor (IFNGR) besteht aus zwei Untereinheiten, einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ - Kette. Bindet IFN- $\gamma$  seinen Rezeptor kommt es zur Ausbildung eines Heterotetramers, das sich aus zwei  $\alpha$ - Ketten, zwei  $\beta$ - Ketten und zwei IFN Molekülen zusammensetzt (Farrar and Schreiber, 1993). Anschließend wird STAT1 durch die Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinasen Jak1 und Jak2 phosphoryliert und bildet  $\gamma$ -Activated Factor (GAF) genannte STAT1 Homodimere aus. Nach der Translokation in den Zellkern bindet GAF an Promotoren, die Gamma Activated Sequence (GAS) –Elemente in ihrer Sequenz enthalten und stimuliert deren Expression. Unter den primär induzierten Genen befinden sich Transkriptionsfaktoren wie IRF-1 und der „Class II Transactivator“ (CIITA), die für die sekundären IFN- $\gamma$  Effekte verantwortlich sind. Dazu zählt die Geninduktion der MHC Klasse I und II Moleküle sowie die transkriptionelle Aktivierung antiviraler Gene (Bach et al., 1997).

### 1.3.3. Wichtige ISGs mit antiviraler Aktivität

PKR, die 2'-5'-Oligoadenylate Synthetasen (2'-5'-OAS) und die Mx Proteine gehören zu den wichtigsten IFN induzierten Proteinen mit antiviraler Wirkung. Im Gegensatz zu Mx werden PKR und einige der 2'-5'-OAS Gene sowohl durch IFN $\alpha/\beta$  als auch durch IFN- $\gamma$  transkriptionell induziert. Um ihre antivirale Wirkung zu erzielen müssen PKR und 2'-5'-OAS durch dsRNA, ein bei der viralen Replikation häufig anzutreffendes Intermediat, aktiviert werden (Gribaudo et al., 1991; Haines et al., 1991). Anschließend verhindern beide Proteine die Synthese viraler Proteine. Dazu inhibiert PKR die Translation der viralen dsRNA und 2'-5'-OAS initiiert die RNaseL abhängige Degradation der dsRNA Moleküle. Die Myxovirus-Resistenz (Mx) Proteine gehören zur Familie der GTPasen und sind je nach Spezies im Zytosol oder im Zellkern lokalisiert (Julkunen et al., 2001). Die meisten Labor-Mausstämme besitzen kein funktionelles Mx1 Protein und sind daher anfälliger für Influenza A Infektionen (Zilberstein et al., 1976). Das humane MxA Protein inhibiert ebenfalls das Influenza A Virus, allerdings greift es erst zu einem sehr späten Zeitpunkt in den Replikationszyklus des Virus ein (Pavlovic et al., 1992). Im Gegensatz dazu blockiert das murine Mx1 die primäre Transkription der viralen RNAs (Krug et al., 1985; Pavlovic et al., 1992). Die Mx Proteine sind aber auch bei der Abwehr anderer RNA Viren wie vom Masern Virus, vom Vesikulär Stomatitis Virus (VSV) und vom Thogoto Virus essentiell (Arnheiter et al., 1996; Pavlovic et al., 1995). Der genaue Wirkmechanismus ist noch nicht bekannt. Mäuse die weder funktionelles PKR, RNaseL

noch Mx1 besitzen zeigen immer noch einen schwachen IFN induzierten Virusschutz (Zhou et al., 1999). Daher muss es noch weitere, bisher unbekannte IFN induzierte, antivirale Mechanismen geben.

#### **1.3.3.1. Viperin**

Obwohl Viperin ein evolutionär hoch konserviertes, phylogenetisch weit verbreitetes Protein ist, wurde es im Vergleich zu den oben beschriebenen Proteinen erst sehr spät als ISG mit antiviraler Aktivität erkannt. In Abhängigkeit vom Virus wird Viperin über den klassischen Typ I IFN Weg, IFN- $\gamma$  oder durch einen IFN unabhängigen Weg induziert (Boudinot et al., 2000; Grewal et al., 2000; Helbig et al., 2005). Das induzierte Viperin hilft der Zelle die Vermehrung des Virus einzudämmen. So wurde gezeigt, dass die Überexpression von Viperin die HCMV Produktion und die HCV Replikation reduziert (Chin and Cresswell, 2001; Helbig et al., 2005). Außerdem ist Viperin für die pIC induzierte Inhibition der HIV-1 Replikation essentiell (Rivieccio et al., 2006). Obwohl die antivirale Aktivität von Viperin bereits mehrfach nachgewiesen wurde, ist der Mechanismus weiterhin unbekannt. Die schnelle und starke Induktion der Viperin Expression durch verschiedene Viren und mikrobielle Produkte wie LPS lässt jedoch vermuten, dass Viperin eine wichtige Komponente des angeborenen Immunsystems bei der Abwehr diverser Pathogene ist.

### **1.4. Aufgabenstellung**

IRF-1 ist ein multifunktionelles Mitglied der IRF-Familie, welches immunmodulatorische, antivirale, tumorsuppressive und antiproliferative Eigenschaften besitzt (Kröger et al., 2002). In seiner Funktion als transkriptioneller Aktivator induziert IRF-1 eine Reihe von Zielgenen. Auf Grund des zeitlich verzögerten Auftretens einiger IRF-1 Effekte wurde eine indirekte Wirkung vermutet. Um diese Hypothese zu überprüfen sollten IRF-1 regulierte Gene, die für die diversen IRF-1 vermittelten Effekte verantwortlich sind, mit Hilfe von Genexpressionsanalysen identifiziert werden.

Bei früheren Analysen der antiproliferativen IRF-1 Effekte hatte sich gezeigt, dass die Überexpression von IRF-1 zum Anstieg von transformierten Zellen in der G1 Phase des Zellzyklus führt (Kirchhoff et al., 1995; Kirchhoff et al., 1996; Kröger et al., 2003). Da das unkontrollierte Wachstum ein wichtiges Merkmal für die Transformation von Zellen ist wurde vermutet, dass dieser antiproliferative Effekt entscheidend zur IRF-1 vermittelten Reversion des transformierten Phänotyps beiträgt. In diesem Fall könnte die Aufklärung des

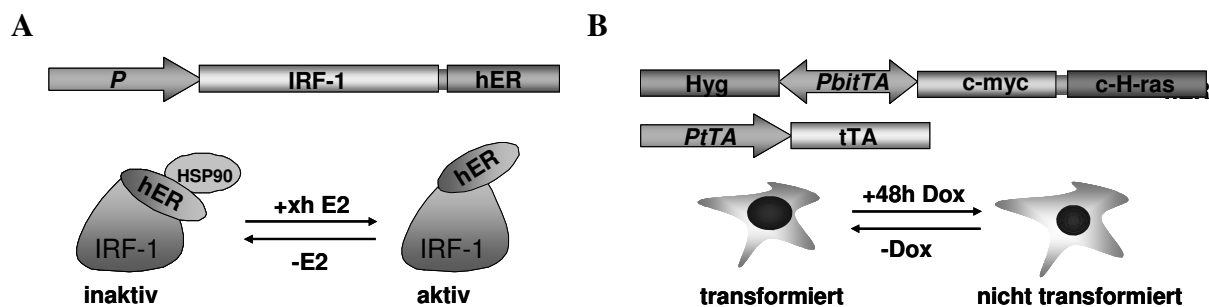
antiproliferativen Wirkmechanismus wichtige Erkenntnisse für die Therapie humaner Tumore liefern. Aus diesem Grund sollte der Einfluss von IRF-1 auf die Proteine des G1 Zellzyklusphasen-Kontrollpunktes genauer untersucht werden.

Viele der bereits bekannten direkten IRF-1 Zielgene kodieren für Proteine mit antiviraler Aktivität. Dazu gehören IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , 2'-5'-OAS, PKR, GBP1/2/3, CCL5 und die MHC Klasse I Proteine (Briken et al., 1995; Chang et al., 1992; Fujita et al., 1988; Harada et al., 1989; Kirchhoff et al., 1995; Liu et al., 2005; Lohoff et al., 1997; Olszewski et al., 2006; Ramsauer et al., 2007; Reis et al., 1992). Durch die Expressionsanalysen sollte geprüft werden, ob weitere direkte IRF-1 Zielgene identifizierbar sind. Des Weiteren sollte für ausgewählte Gene untersucht werden, ob ihre Genprodukte Wirkung zeigen.

## 2. Ergebnisse

### 2.1. Identifizierung von IRF-1 regulierten Genen

Der Einfluss von IRF-1 wurde in rekombinanten NIH3T3 Zellen (myc/rasNIH3T3IH) untersucht, in denen auch der Einfluss der Onkogene c-myc und c-H-ras analysierbar ist. In den myc/rasNIH3T3IH Zellen wird IRF-1 als Östradiol (E2) aktivierbares Fusionsprotein (IRF-1hER) mit der Ligand bindenden Domäne des humanen Östrogenrezeptors (hER) exprimiert (Abb.4A) (Kröger et al., 2003). Die Bindung von Östradiol an das IRF-1hER Fusionsprotein führt zur Translokation und damit zur Aktivierung von IRF-1 regulierten Genen (Kirchhoff et al., 1993). Da die DNA bindende Domäne des Östrogenrezeptors in der fusionierten Domäne nicht enthalten ist (Kirchhoff et al., 1993; Kumar et al., 1986), sollte es ausschließlich zur Induktion IRF-1 regulierter Gene und nicht zur Induktion von hER Zielgenen kommen. Auf Grund der antiproliferativen Eigenschaften von IRF-1 ist eine längerfristige Kultivierung der Zellen nur möglich, wenn das IRF-1hER inaktiv ist. Die Expression der Onkogene c-myc und c-H-ras wird in den myc/rasNIH3T3IH Zellen Doxyzyklin abhängig reguliert (Abb.4B). Das hierfür verwendete transkriptionelle Regulationssystem basiert auf dem Tetrazyklin-Resistenzsystem aus *E.coli* und wurde für die Verwendung in Säugerzellen adaptiert (Gossen and Bujard, 1992). Der Transaktivator (tTA), ein Fusionsprotein aus dem *E. coli* Tn10 Tet-Repressor und der transaktivierenden Domäne (VP16) des Herpes Simplex Virus (Sadowski et al., 1988) kann in Abwesenheit von Tetrazyklin und dessen Derivaten (z.Bsp. Doxyzyklin) an das Tetrazyklin- Operon der tTA



**Abb.4 Schematische Darstellung des myc/rasNIH3T3IH Zellsystems**

- 10 Die myc/rasNIH3T3IH Zellen exprimieren das IRF-1hER Fusionsprotein konstitutiv. Die Bindung von Östradiol (E2) an das Fusionsprotein führt zu einer Änderung der Konformation und somit zur Aktivierung von IRF-1. Die Zeitspanne der IRF-1 Aktivierung kann variiert werden (+xh E2). (B) Die Expression der Onkogene c-myc und c-H-ras wird Doxyzyklin abhängig reguliert. In Abwesenheit von Doxyzyklin (-Dox) bindet der Transaktivator (tTA) an den bidirektionalen tTA Promotor (PbitTA). In Folge dessen kommt es zur Expression der Onkogene und die Zellen haben einen transformierten Phänotyp. Durch Zugabe von Doxyzyklin (+Dox) kann der Transaktivator nicht mehr an den Promotor



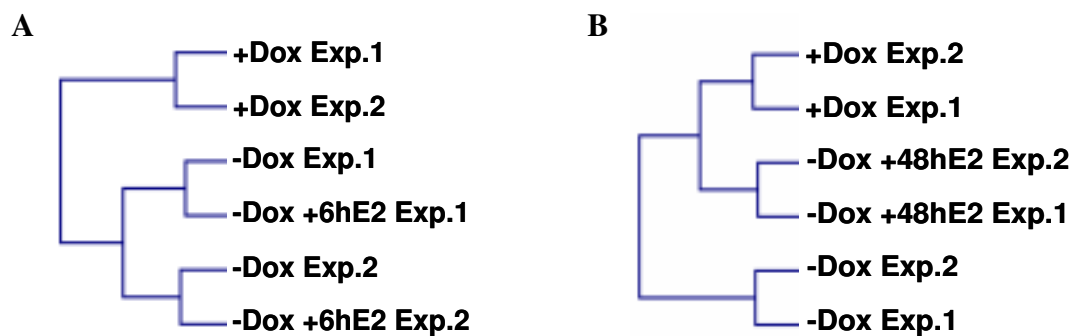
binden, die Expression von c-Myc und c-H-ras ist inhibiert und die Zellen besitzen einen nicht-transformierten Phänotyp. Um den nicht-transformierten Phänotyp zu etablieren werden die transformierten Zellen für 48h mit Doxyzyklin behandelt

abhängigen Promotoren binden. Der für die Expression der Onkogene verwendete bidirektionale tTA-Promotor (PbitTA) besteht aus sieben Sequenzwiederholungen des Tetrazyklin-Operons (tetO), die an beiden Seiten von einem humanen CMV-Minimalpromotor ( $P_{hCMVmin}$ ) flankiert werden (Baron et al., 1995). Durch die Verwendung des bidirektionalen Promotors ist die Expression der Onkogene an die Expression der Hygromycinphosphotransferase (Hyg) gekoppelt. Um gegen den Verlust des Konstruktes selektieren zu können, wurden die Zellen im transformierten Zustand passagiert.

### **2.1.1. IRF-1 beeinflusst das Expressionsprofil transformierter Zellen**

Die ersten IRF-1 vermittelten Veränderungen, die zur Reversion des transformierten Phänotyps der myc/rasNIH3T3IH Zellen beitragen (z.B. im Zellwachstum), sind in Zellkulturversuchen schon nach 6h zu beobachten. Richtig ausgeprägt sind die Effekte jedoch erst 48h nach der Aktivierung von IRF-1 (Kröger et al., 2003 und unveröffentlichte Daten). Um zu sehen, welche Gene für die beobachteten physiologischen Veränderungen verantwortlich sind, wurden Genexpressionsanalysen durchgeführt. Mit Hilfe von Genexpressionsanalysen konnten Unterschiede in den Genexpressionsprofilen transformierter Zellen untersucht werden, in denen IRF-1 inaktiv (-Dox) oder für 6h (-Dox +6hE2) bzw. 48h (-Dox +48hE2) aktiv war. Die Genexpression von Zellen im nicht-transformierten Zustand (+Dox) wurde analysiert, um den transkriptionellen Einfluss der Onkogene (c-myc, c-H-ras) bestimmen zu können. Das Expressionsmuster der Zellen unterliegt auf Grund technischer und biologischer Faktoren starken Schwankungen (Cui and Churchill, 2003). Daher wurde jeweils eine Probe desselben Zustandes aus zwei unabhängigen Experimenten auf separaten „Chips“ untersucht. Um festzustellen wie ähnlich bzw. unterschiedlich die Genexpression in den verschiedenen Zuständen der myc/rasNIH3T3 Zellen ist, wurden die Expressionsprofile einem hierarchischen „Clustering“ (HCL) unterzogen. Bei dieser Art von Analyse wird ein Vergleich der unterschiedlichen Zustände bezüglich ihrer Genexpression vorgenommen (Eisen et al., 1998). Ähnliche Profile werden gruppiert und auf denselben Ästen des Dendrogrammes dargestellt. Je kürzer die verbindenden Linien sind, desto mehr Ähnlichkeiten besitzen die Genexpressionsprofile. Für jeden der vier Zustände wurden die Signalstärken sämtlicher auf dem Chip vorhandener ProbeSetIDs, von beiden Experimenten, in die HCL Analyse einbezogen.

In der ersten Analyse wurden die Genexpressionsprofile nicht-transformierter (+Dox), transformierter (-Dox) und transformierter Zellen in denen IRF-1 für 6h aktiviert war (-Dox +6hE2) einem „Clustering“ unterzogen (Abb.5A). Das resultierende Dendrogramm besteht aus zwei Hauptästen. Der erste Ast repräsentiert die beiden Datensätze der nicht-transformierten Zellen (+Dox). Der zweite Ast verzweigt sich ein weiteres Mal, wobei jeweils die Genexpressionsprofile von -Dox und -Dox +6hE2 Zellen aus dem gleichen Experiment zusammen einen Seitenast bilden. Die hohe Ähnlichkeit der -Dox und -Dox +6hE2 Proben desselben Experiments zeigt, dass die Anzahl der IRF-1 regulierten Gene geringer ist, als die Anzahl von Genen deren Genexpression in Folge von experimentellen Schwankungen verändert wurde.



#### **Abb.5 IRF-1 induziert Veränderungen im Expressionsprofil transformierter Zellen**

Die Signalintensitäten sämtlicher ProbeSetIDs von nicht-transformierten Zellen (+Dox), transformierten Zellen (-Dox) und transformierten Zellen in denen IRF-1 für 6h (-Dox +6h E2) oder 48h (-Dox +48h E2) aktiv war, wurden mit dem Programm „TIGR Multiple Experiment Viewer“, (Saeed et al., 2003) analysiert. Dazu wurden sie normalisiert und mittels hierarchischem „Clustering“ gruppiert. Für das „Clustering“ wurde der „Average linkage“ Algorithmus verwendet und als Distanzmaß diente die euklidische Distanz. Gezeigt sind Dendrogramme die aus der Analyse von **(A)** +Dox, -Dox und -Dox +6h E2 bzw. **(B)** +Dox, -Dox und -Dox +48h E2 resultieren. Die Bezeichnungen Exp.1 und Exp.2 geben an, von welchem Experiment der Datensatz stammt.

Eine weitere Clusteranalyse wurde mit den Genexpressionsprofilen von nicht-transformierten (+Dox), transformierten (-Dox) und transformierten Zellen in denen IRF-1 für 48h aktiviert war (-Dox +6hE2) durchgeführt (Abb.5B). Auch dieses Dendrogramm besitzt zwei Hauptäste, wobei ein Hauptast die beiden Proben der transformierten Zellen repräsentiert. Der zweite Hauptast teilt sich weiter auf, wobei jeweils die beide Proben der +Dox Zellen und die beiden Proben der -Dox +48h E2 Zellen einen Seitenast bilden. Diese Clusteranalyse zeigt, dass sich das Expressionsprofil transformierter Zellen gegenüber dem Profil von nicht-transformierten Zellen deutlich unterscheidet. Durch die Aktivierung von IRF-1 für 48h kommt es zu starken Veränderung der Genexpression und die Zellen weisen eine hohe Ähnlichkeit mit dem Expressionsprofil nicht-transformierter Zellen auf.

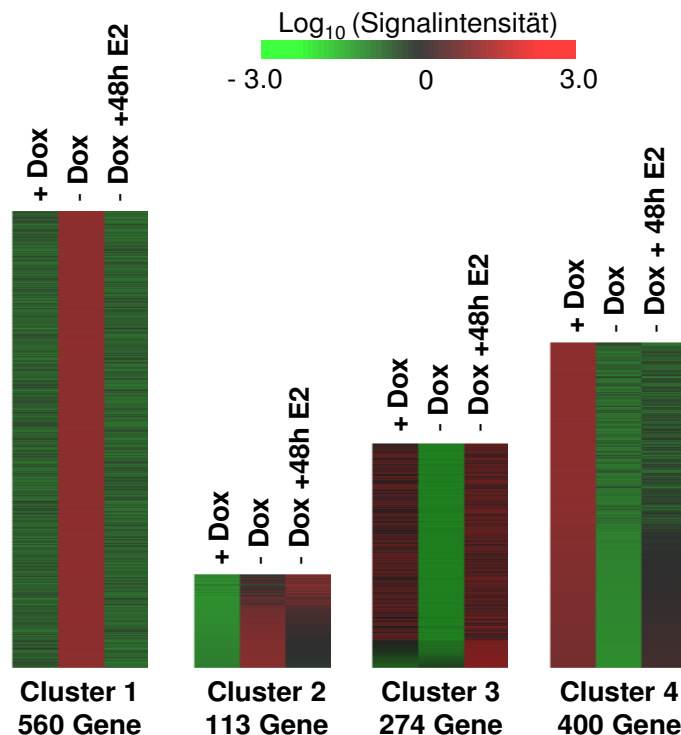
### 2.1.2. IRF-1 revertiert die Expression von Onkogen-deregulierten Genen

HCL Analysen haben gezeigt, dass die Aktivierung von IRF-1 das Expressionsprofil transformierter Zellen so verändert, dass es dem von nicht-transformierten Zellen ähnelt (Abb.5B). Auf Grund dieser Daten wurde vermutet, dass IRF-1 die Reversion der Transformation vermittelt, indem es den transkriptionellen Einfluss der Onkogene revertiert. Um diese Hypothese eingehender untersuchen zu können, mussten zunächst die Gene identifiziert, deren Transkription durch die Expression von c-myc und c-H-ras und durch die Aktivierung von IRF-1 differentiell reguliert wird (Tabelle 1). Ein Gen wurde nur dann als reguliert gewertet, wenn der Induktionsfaktor in beiden Experimenten  $\geq 1.5$  oder  $\leq -1.5$  war. Da insbesondere niedrig exprimierte Gene hohen Schwankungen unterliegen wurden nur solche Gene gewertet, die bei jedem Experiment in mindestens einem Zustand ein Signalschwellenwert von 50 überschritten haben.

**Tabelle 1: Anzahl der differentiell regulierten Gene**

Vergleich:	Anzahl regulierter Gene		
	induziert	reprimiert	$\Sigma$
+Dox mit -Dox	715	733	1448
-Dox +6hE2 mit -Dox	286	153	439
-Dox +48hE2 mit -Dox	786	844	1630

Die Expression der Onkogene c-myc und c-H-ras verändert die Transkription von 1448 ProbeSetIDs, was 1347 Genen entspricht (Tabelle 1 und Anhang, Tabelle 1). Um zu zeigen, ob IRF-1 die Expression dieser Gene revertiert und dadurch das Expressionsprofil der transformierter Zellen normalisiert, wurden diese Gene einem „k-means Clustering“ unterzogen (Tavazoie et al., 1999). Bei dieser Art von Cluster-Analyse werden die Proben nicht anhand ihrer Expressionsprofile gruppiert, sondern Gene mit ähnlichem Expressionsmuster werden demselben „Cluster“ zugeordnet. Die Anzahl der „Cluster“ wird durch den Benutzer vorgegeben. Für jedes der 1347 deregulierten Gene wurde der Mittelwert aus den Signalen von Exp.1 und Exp.2 bestimmt. Die Signale folgender Proben wurden analysiert: Nicht-transformierte Zellen (+Dox), transformierte Zellen (-Dox) und transformierte Zellen in denen IRF-1 für 48h aktiv war (-Dox +48h E2). Die Signale von transformierten Zellen in denen IRF-1 6h aktiv war wurden nicht in die Analyse miteinbezogen, da zu diesem Zeitpunkt noch



**Abb.6 IRF-1 revertiert die Expression von c-myc/c-H-ras deregulierten Genen**

Die Mittelwerte der Signalintensitäten von Exp.1 und Exp.2 wurden in das Programm „TIGR Multiple Experiment Viewer“, importiert. Nach der Normalisierung wurde ein „k-Means Clustering“ mit euklidischer Distanz als Distanzmaß durchgeführt. Die vier Cluster sind als Farbbilddarstellung abgebildet. Rote Quadrate bedeuten, dass die Signalintensität höher ist, als der Mittelwert aller Signale dieses Genes. Grüne Quadrate bedeuten, dass ein Gen in der entsprechenden Probe, im Vergleich zum Mittelwert, eine niedrigere Signalintensität besitzt.

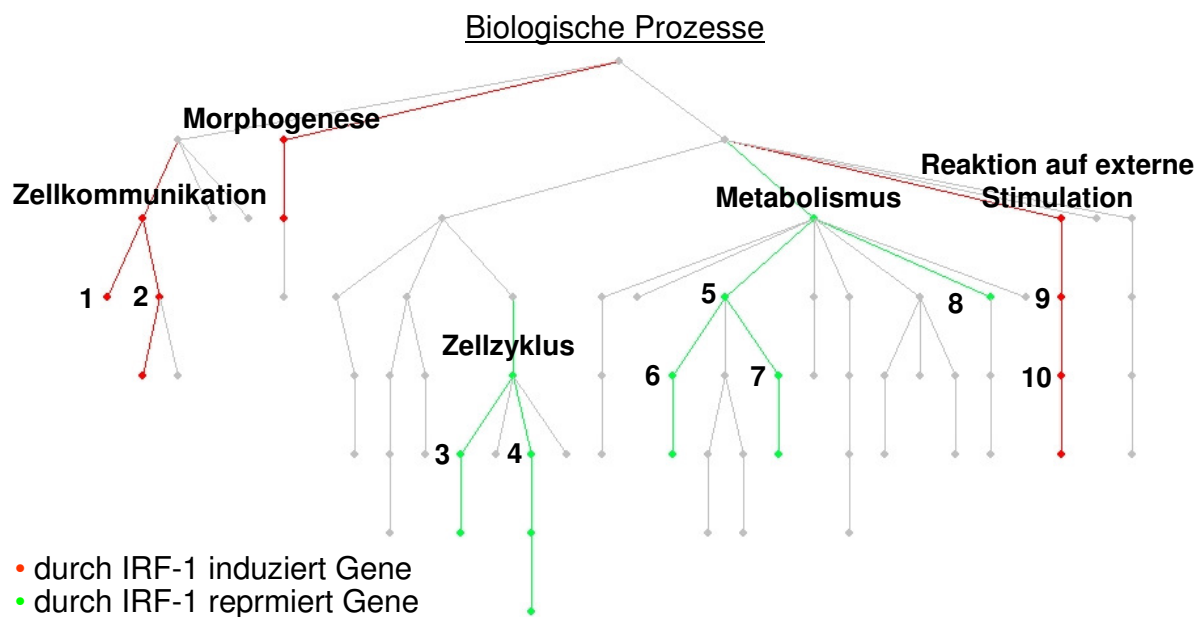
Keine signifikanten Veränderungen des Expressionsprofils festzustellen waren (Abb.6). In Cluster 2 und 4 wurden insgesamt 513 Gene zusammengefasst, bei denen die Aktivierung von IRF-1 in den transformierten Zellen keinen Einfluss auf die Expression hat (Abb.6). Die Expression der 834 Gene aus Cluster 1 und 3 ist bei den transformierten Zellen, nach der Aktivierung von IRF-1, ähnlich hoch wie in nicht-transformierten. Diese Daten zeigen, dass IRF-1 die Expression von über 60% der durch c-myc und c-H-ras deregulierten Gene revertiert.

### 2.1.3. IRF-1 vermittelt transkriptionelle Veränderungen die mit den physiologischen IRF-1 Effekten korrelieren

Die Expression der Onkogene c-myc und c-H-ras verändert die Transkription von 1347 Genen. Bei 834 (60%) dieser Gene wird die veränderte Transkription durch die Aktivierung von IRF-1 revertiert (Abb.6). Somit ist die transkriptionelle Regulierung dieser Gene wahrscheinlich entscheidend für die IRF-1 vermittelte Reversion des transformierten Phänotyps. Um eine grobe Übersicht zu bekommen, an welchen biologischen Prozessen die Genprodukte der durch IRF-1 normalisierten Gene beteiligt sind, wurden „Gene Ontology“ (GO) Analysen durchgeführt. Das „Gene Ontology Consortium“ (Ashburner et al., 2000) annotiert Gene nach der molekularen Funktion und dem zellulären Kompartiment in dem sich die Genprodukte befinden sowie den biologischen Prozessen, an denen sie beteiligt sind. Die Annotationen beginnen mit allgemeinen Begriffen und werden zunehmend spezifischer. Sie werden

vereinfacht als Baum dargestellt. Das Programm „GOSurfer“ (Zhong et al., 2004) nutzt die Annotationen des „Gene Ontology Consortiums“ und vergleicht Genlisten auf eine statistisch signifikante Anzahl von Genen, deren Genprodukte am selben biologischen Prozess beteiligt sind.

In die Analyse eingegangen sind jene 834 Gene, deren Expression durch die Aktivierung von IRF-1 reprimiert wurde (Abb.7). „Äste“ in denen sich ein statistisch signifikanter Anteil von Genen befindet, deren Expression durch die Transformation induziert und durch IRF-1 wieder reprimiert wurde sind in grün dargestellt. Die Gene kodieren Proteine, die am Metabolismus und am Zellzyklus beteiligt sind. Dieses Resultat korreliert mit Daten aus Zellkultur Versuchen die zeigen, dass die Aktivierung von IRF-1 den Metabolismus und die Proliferation transformierter Zellen inhibiert (Kirchhoff and Hauser, 1999; Kröger et al., 2003; Kröger et al., 2001). In den rot dargestellten Ästen befindet sich ein signifikant hoher Anteil von Genen, deren Expression durch die Transformation reprimiert und durch IRF-1 wieder induziert wurde. Die Produkte dieser Gene sind an der Zellkommunikation, der Morphogenese und an der Reaktion auf externe Stimuli beteiligt (Abb.7). Auch dieses Ergebnis korreliert mit den in



**Abb.7 „Gene Ontology“ (GO) Analyse der durch IRF-1 normalisierten Gene**

GO Analyse der Gene, deren Expression durch die myc/ras Transformation dereguliert und durch IRF-1 wieder normalisiert wurde, durch das Programm „Go-Surfer“. Der dargestellte Baum besteht aus Annotationen, denen mindestens 10 der 834 untersuchten Gene zugeordnet wurden. Rote Äste stehen für biologische Prozesse, in denen die durch IRF-1 induzierten Gene überrepräsentiert sind. Grüne Äste stehen für biologische Prozesse, in denen die durch IRF-1 reprimierten Gene überrepräsentiert sind. Graue Äste stehen für biologische Prozesse, in denen weder die durch IRF-1 induzierten noch die durch IRF-1 reduzierten Gene signifikant überrepräsentiert sind. Die Nummern stehen für folgende Annotationen: 1 Zelladhäsion; 2 Signaltransduktion; 3 DNA Replikation; 4 mitotischer Zellzyklus; 5 Nukleotidmetabolismus; 6 RNA Metabolismus; 7 DNA Metabolismus; 8 Biosynthese; 9 Reaktion auf biotische Stimuli; 10 Pathogenabwehr.

Zellkultur gewonnenen Daten. Sie zeigen, dass transformierte Zellen in denen IRF-1 aktiv ist wieder auf Einflüsse wie Zell- bzw. Oberflächenkontakt reagieren können (Kröger et al., 2003). Damit spiegeln sich viele Effekte die IRF-1 in transformierten Zellen vermittelt auch auf der Genexpressionsebene wieder.

Die Daten der GO-Analyse und die Tatsache, dass die antiproliferativen Effekte von IRF-1 in transformierten Zellen viel stärker als in nicht-transformierten Zellen sind (Kröger et al., 2003), führten zu der Vermutung, dass diese Zellzyklus-regulierenden Effekte entscheidend zur Reversion des transformierten Phänotyps beitragen. Die Gene aus Cluster 1 und 3 (Abb.6), deren Expression durch die Aktivierung von IRF-1 revertiert wurde und deren Genprodukte die antiproliferativen Effekte in den Onkogen transformierten myc/rasNIH3T3 Zellen vermitteln könnten sind in Tabelle 2 aufgeführt.

**Tabelle 2: IRF-1 regulierte Gene, die durch die Onkogene dereguliert werden und für Proteine mit Zellzyklus regulierenden Eigenschaften kodieren**

ProbeSetID	Gen Symbol	Titel
102772_at	Abl1	v-abl Abelson murine obility oncogene 1
160903_at	Apbb2	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 2
101180_at	Atm	ataxia telangiectasia mutated homolog (human)
93536_at	Bax	Bcl2-associated X protein
101521_at	Birc5	baculoviral IAP repeat-containing 5
102976_at	Brca1	breast cancer 1
102911_at	Brca2	breast cancer 2
100453_at	Camk2b	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, beta
98436_s_at	Casp3	caspase 3, apoptosis related cysteine protease
160159_at	Ccnb1	cyclin B1
94294_at	Ccnb2	cyclin B2
94231_at	Ccnd1	cyclin D1
94232_at	Ccnd1	cyclin D1
99073_at	Ccnf	cyclin F
98478_at	Ccng2	cyclin G2
100128_at	Cdc2a	cell division cycle 2 homolog A (S. pombe)
96319_at	Cdc20	cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)
102934_s_at	Cdc25c	cell division cycle 25 homolog C (S. cerevisiae)
102935_at	Cdc25c	cell division cycle 25 homolog C (S. cerevisiae)
100128_at	Cdc2a	cell division cycle 2 homolog A (S. pombe)
103821_at	Cdc6	cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae)
103064_at	Chek1	checkpoint kinase 1 homolog (S. pombe)
97468_at	Cks1	CDC28 protein kinase 1
97468_at	Cks1	CDC28 protein kinase 1
97527_at	Cks2	CDC28 protein kinase 2
101429_at	Ddit3	DNA-damage inducible transcript 3
161726_f_at	Dnm2	dynamain 2
98305_at	Foxm1	forkhead box M1
94813_at	Gas1	growth arrest specific 1
94338_g_at	Gas2	growth arrest specific 2
103270_at	Gtse1	G two S phase expressed protein 1
92504_at	Hus1	Hus1 homolog (S. pombe)
102266_at	Inha	inhibin alpha
92790_at	Kpna2	karyopherin (importin) alpha 2
99632_at	Mad2l1	MAD2 (mitotic arrest deficient, homolog)-like 1 (yeast)
99457_at	Mki67	antigen identified by monoclonal antibody Ki 67
100033_at	Msh2	mutS homolog 2 (E. coli)
100885_at	Nek2	NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 2
101554_at	Nfkbia	nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
101065_at	Pcna	proliferating cell nuclear antigen
97375_at	Pkd1	polycystic kidney disease 1 homolog
102395_at	Pmp22	peripheral myelin protein, 22 kDa

95092_at	Ppp3ca	protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isoform
95032_at	Prc1	protein regulator of cytokinesis 1-like
99005_at	Rad1	RAD1 homolog (S. pombe)
104527_at	Rad51	RAD51 homolog (S. cerevisiae)
101254_at	Ran	RAN, member RAS oncogene family
104476_at	Rbl1	retinoblastoma-like 1 (p107)
95124_i_at	Rbx1	ring-box 1
160359_at	Rgc32	RIKEN cDNA 1190002H23 gene
162011_f_at	Arhu	ras homolog gene family, member U
96747_at	Arhu	ras homolog gene family, member U
95427_at	Rpa1	replication protein A1 (70 kDa)
101959_r_at	Tfdp1	transcription factor Dp 1
101958_f_at	Tfdp1	transcription factor Dp 1
160519_at	Timp3	tissue inhibitor of metalloproteinase 3
104275_g_at	Trp53	transformation related protein 53
162125_f_at	Ubc	ubiquitin C
104738_at	Zrf2	zuotin related factor 2

#### 2.1.4. Identifizierung direkter IRF-1 Zielgene

Bisher konnten 834 Gene identifiziert werden, deren Transkription durch die Onkogene c-myc und c-H-ras dereguliert und durch IRF-1 wieder normalisiert wurde (Abb.8). Da IRF-1 in diesen Experimenten 48h wirken konnte, um die Veränderungen im Expressionsprofil der transformierten Zellen zu erzielen, handelt es sich bei den 834 Genen wahrscheinlich um eine Mischung aus direkten und indirekten IRF-1 Zielgenen. Die Regulation der indirekten IRF-1 Zielgene setzt die transkriptionelle Aktivierung direkter oder primärer IRF-1 Zielgene voraus. Diese sollten mit Hilfe der Genexpressionsanalysen identifiziert werden. Um die Expression sekundärer IRF-1 Zielgene zu verhindern, wurde die Translation der myc/rasNIH3T3IH Zellen 2h vor der IRF-1 Aktivierung durch Cykloheximid (CHX) inhibiert. Das Expressionsprofil der Zellen wurde 4h und 6h nach der IRF-1 Aktivierung analysiert. Da CHX die basale Expression einiger Gene erhöht (Ghersa et al., 1992; Roger et al., 1998), erfolgte die Berechnung des Induktionsfaktors im Vergleich zu CHX behandelten Zellen in denen IRF-1 inaktiv war. Die Gene galten nur dann als differentiell reguliert, wenn sie einen Schwellenwert von 50 überschritten hatten und ihr Induktionsfaktor  $\geq 3.0$  war. Bei insgesamt 83 Genen treffen die Kriterien zu und sie können als direkte IRF-1 Zielgene definiert werden (Anhang, Tabelle 2). Achtzehn dieser Gene (22%) sind in der Literatur bereits als IRF-1 reguliert beschrieben (Anhang, Tabelle 2).

IRF-1 vermittelt die transkriptionelle Induktion von Genen durch die Bindung an eine IRF-E genannte Promotorsequenz. Es wird davon ausgegangen, dass das Vorhandensein von IRF-Es im Promotor der Gene Voraussetzung für die direkte transkriptionelle Aktivierung durch IRF-1 ist. Die Promotoren der nicht als IRF-1 reguliert beschriebenen Gene wurden deswegen auf potentielle IRF-Es untersucht. Es gibt verschiedene Programme mit deren Hilfe eine Promotorsequenz auf mögliche Bindestellen von Transkriptionsfaktoren untersucht werden

kann. Für die Analyse wurde das auf TRANSFAC, IMD und der CBIL-GibbsMat Datenbank basierende Programm TESS verwendet. Es wurde der Promotorbereich bis 2000 Nukleotide oberhalb des Transkriptionsstarts untersucht. Die potentiellen IRF-Es mussten mindestens 70% Homologie zur Konsensussequenz  $G(A)AAA^{G/C^T}/C^{G/T}GAAA^{G/C^T}/C$  aufweisen (Tanaka et al., 1993). Bei 37 der noch nicht beschriebenen IRF-1 Zielgene wurden ein oder mehrere IRF-Es im Promotor identifiziert (Tabelle 3). Wahrscheinlich reguliert IRF-1 die Expression dieser Gene über die Interaktion mit den identifizierten IRF-Es. Über welche Mechanismen IRF-1 die Expression der restlichen 28 Gene regulieren könnte wird im Kapitel 3.1.2. diskutiert.

**Tabelle 3: Mittels TESS identifizierte IRF-Es im Promotor direkter IRF-1 Zielgene**

ProbeSetID	Gene Symbol	potentielle IRF-Es		
		Position	Sequenz	Homologie zur Konsensussequenz
161947_f_at	Alox12e	-1897 bis -1884	gTTaTCtCTTTCt	70%
101180_at	Atm	-398 bis -388	CTTT-ACCTTTGG	92%
161028_at	Bmp6	-1606 bis -1594	cAAaACTGAAAGT	85%
100127_at	Crabp2	-1568 bis -1557	CTTaGACTTTTCG	92%
101845_s_at	Csprs	-962 bis -953	GAAAGTaAAA-T	83%
		-1679 bis -1668	GAAgaTGAACt	83%
		-1049 bis -1039	CTTTCtCTTcCt	75%
100675_at	Gabrr1	-877 bis -865	CtATcCTTTGA	83%
		-459 bis -448	CTTTCtCTTTGc	83%
		-812 bis -802	CTTTGtCTT-CG	83%
104276_at	Glipr2	-947 bis -936	CTTTCtCTTaCG	83%
93949_at	Gnb4	-259 bis -246	CTTTTtCtCTTTCA	85%
92217_s_at	Gp49b	-1024 bis -1013	CtTcTCcCTTTGA	83%
102311_at	Gp9	-180 bis -170	GAA-CTGAAACT	92%
98410_at	Iigp2	-175 bis -164	GAAACTGAAAGC	100%
		-1792 bis -1781	aAAAACaGAAAGg	77%
		-1839 bis -1830	GAA-GaGAAAGg	75%
97334_at	Hes6	-1882 bis -1893	GAAAGaGAA-GT	83%
103833_at	Hipk2	-1569 bis -1579	CTT-CACTTTGA	92%
97409_at	Ifi1	+21 bis +32	CTTcGACTTTTCt	83%
		-1084 bis -1095	CTTTCtCTTTTCt	83%
		-120 bis -131	CTTTCACTTTTGA	100%
100981_at	Ifit1	-101 bis -112	CTTTGACTTTTGA	100%
		-221 bis -232	CTTTCACTTTTGA	100%
		-187 bis -198	CTTTGACTTTGt	92%
93956_at	Ifit3	-1173 bis -1160	GAAAGaGAAAaT	83%
		-237 bis -226	GAAAGaGgAAGC	83%
		-114 bis -125	CTTTT-ACCTTTtA	83%
102148_f_at	Ifna9	-903 bis -892	GAAAA-TGAAAGa	85%
160933_at	Igtp	-208 bis -220	GAAAAGTGAA-Ga	85%
103963_f_at	Iigp-pending			
96764_at				
161023_at	Il15ra	-1954 bis -1965	gTTTGACTTTaA	83%
		-1949 bis -1959	CTTTGG-TTTGA	92%
		-119 bis -108	GAAAAC-GAAAtC	95%
103634_at	Irf9	-1312 bis -1301	GAAcCTGAAAGT	92%
103366_at	Arhgap9	-192 bis -180	CTTTCTCTTcCC	92%
		-926 bis -937	gTTTCTCTTTaC	83%
		-914 bis -925	CTTTG-CTTTGG	92%
98417_at	Mx1	-338 bis -325	CTTTTCtCTTTCA	92%
		-1054 bis -1043	GAAA_TGAAAGT	92%
		-1049 bis -1038	GAAAGTGAAACT	100%
102699_at	Mx2	-442 bis -430	GAAAAGaGAAAGT	92%
		-838 bis -827	cAAAGaGAAAtT	75%
		-1310 bis -1322	GAAAGTGAAACG	92%
161244_f_at	Pstpip1			
99504_at	Siat8c	-242 bis -232	C-TTCACTTTTCG	92%
92471_i_at	Slfn2			
92472_f_at				



92832_at	Socs1	-1877 bis -1866	CTTTGACTTTGG	100%
		-213 bis -201	CTTTCtCTTTGG	92%
		-195 bis -206	CTTTGGCTTTTCG	100%
98405_at	Spi6	-237 bis -226	CTTTCACCTTTCt	92%
102906_at	Tgtp	-326 bis -314	CTTTGACTTTGG	100%
102678_at	Trim21	+6 bis +17	CTTTCACCTTtA	92%
100475_at	Trim25	-446 bis -435	gTTTGGCTTTGA	92%
100030_at	Upp1	-975 bis -987	CTTTTatCTTTCA	83%
		-1637 bis -1626	CTTTTC-CTTTCA	92%
95024_at	Usp18	-1126 bis -1137	CTTTatCTTTCA	83%
		-150 bis -161	CTTTCGCTTTGA	100%
		-154 bis -144	CTTTC-CTTTGG	92%
		-1813 bis -1800	CTTTCtCTTaCG	83%
104177_at	Vig1-pending	-138 bis -127	CTTTT-ACCTTCA	92%
		-125 bis -113	GAAACaGAAACT	92%
A/C/G/T :	konserviert Nukleotide			
a/c/g/t :	nicht konservierte Nukleotide			
- :	fehlendes Nukleotid			

Um einen Überblick zu erhalten an welchen biologischen Prozessen die Genprodukte der direkten IRF-1 Zielgene beteiligt sind, wurden sie einer „Gene Ontology“ Analyse unterzogen. Die Genprodukte der 83 direkt durch IRF-1 regulierten Gene waren ausschließlich in der Kategorie „Reaktion auf externe Stimuli“ überrepräsentiert. Da die Annotationen bereits aus dem Jahr 2000 stammen, wurden Literaturrecherchen durchgeführt um zu überprüfen, ob noch weitere direkte IRF-1 Zielgene dieser Kategorie zuzuordnen sind. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass insgesamt 39 der 83 direkten IRF-1 Zielgene Proteine kodieren, die eine Funktion bei der Abwehr von Pathogenen besitzen (Tabelle 4). Der hohe Prozentsatz (47%) von Genprodukten die an der Pathogenabwehr beteiligt sind korreliert mit Daten aus IRF-1 defizienten Mäusen (IRF-1<sup>-/-</sup>), die zeigen dass der Verlust von IRF-1 zu erheblichen Defekten in der Entwicklung von Immunzellen führt (zusammengefasst durch Kröger et al., 2002; Matsuyama et al., 1993).

**Tabelle 4: Direkte IRF-1 Zielgene, deren Genprodukte an der Pathogenabwehr beteiligt sind**

ProbeSetID	Gene Symbol	Titel
98406_at	Ccl5	chemokine (C-C motif) ligand 5
93858_at	Cxcl10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10
95974_at	Gbp1	guanylate nucleotide binding protein 1
104597_at	Gbp2	guanylate nucleotide binding protein 2
103202_at	Gbp3	guanylate nucleotide binding protein 3
92217_s_at	Gp49b	glycoprotein 49 B
93865_s_at	H2-T10	histocompatibility 2, T region locus 10
101876_s_at	H2-T17	histocompatibility 2, T region locus 17
97173_f_at	H2-T23	histocompatibility 2, T region locus 23
98472_at	H2-T23	histocompatibility 2, T region locus 23
97409_at	Ifi1	interferon inducible protein 1
104750_at	Ifi47	interferon gamma inducible protein
100981_at	Ifit1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1
93956_at	Ifit3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3
101788_f_at	Ifna1	interferon alpha family, gene 1
101790_f_at	Ifna4	interferon alpha family, gene 4
101789_i_at	Ifna4	interferon alpha family, gene 4
101791_f_at	Ifna5	interferon alpha family, gene 5
102148_f_at	Ifna9	interferon alpha family, gene 9
101317_f_at	Ifnab	interferon alpha family, gene B
94145_at	Ifnb	interferon beta, fibroblast

---

160933_at	Igtp	interferon gamma induced GTPase
103963_f_at	Iigp-pending	interferon-inducible GTPase
96764_at	Iigp-pending	interferon-inducible GTPase
103723_at	Il13ra1	interleukin 13 receptor, alpha 1
161023_at	Il15ra	interleukin 15 receptor, alpha chain
104669_at	Irf7	interferon regulatory factor 7
161511_f_at	Isg15	interferon-stimulated protein
98822_at	Isg15	interferon-stimulated protein
103634_at	Isgf3g	interferon dependent positive acting transcription factor 3 gamma
98417_at	Mx1	myxovirus (influenza virus) resistance 1
102699_at	Mx2	myxovirus (influenza virus) resistance 2
93085_at	Psmb9	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 9 (large
92356_at	Ptpn8	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 8
92832_at	Socs1	suppressor of cytokine obility g 1
101465_at	Stat1	signal transducer and activator of transcription 1
103035_at	Tap1	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)
102873_at	Tap2	transporter 2, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)
102906_at	Tgtp	T-cell specific GTPase
102282_g_at	Tnfrsf7	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 7
98030_at	Trim30	tripartite motif protein 30
103066_at	Tyki	thymidylate kinase family LPS-inducible member

---

## 2.2. Charakterisierung der antiproliferativen IRF-1 Effekte

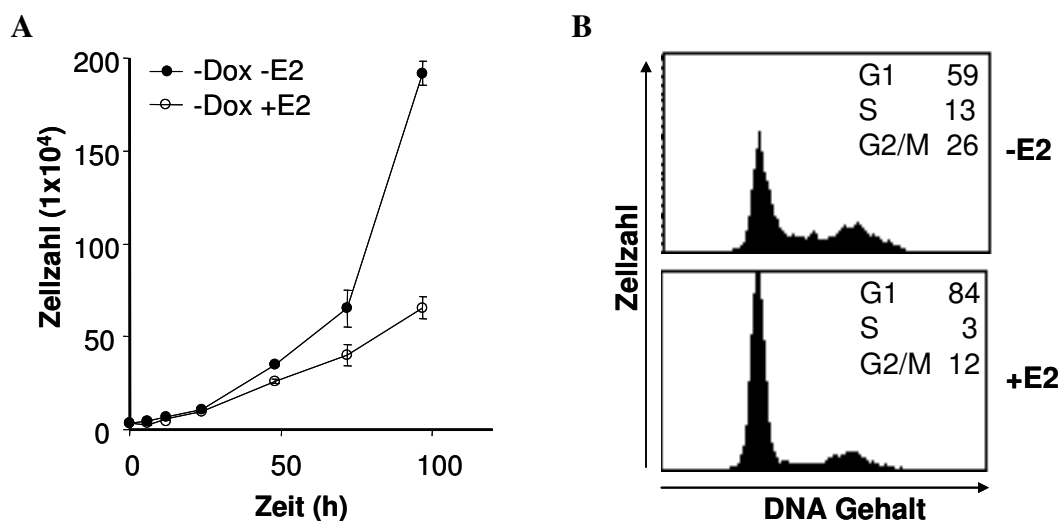
In seiner Funktion als Tumorsuppressor vermittelt IRF-1 immunmodulatorische und antiproliferative Effekte, die zur Eliminierung der Tumorzellen führen (Kröger et al., 2001). Außerdem besitzt IRF-1 die Fähigkeit, den transformierten Phänotyp von Zellen zu revertieren, die durch die Expression verschiedener Onkogene transformiert wurden (Harada et al., 1993; Kirchhoff and Hauser, 1999; Kröger et al., 2003; Tanaka et al., 1994b). Genexpressionsanalysen zeigen, dass IRF-1 die Expression von über 60% aller Gene revertiert, die infolge der c-myc/c-H-ras Transformation dereguliert werden (Abb.6). Viele dieser Gene kodieren Proteine mit Zellzyklus-regulierenden Eigenschaften (Tabelle 2), was den Schluss nahe legt, dass die antiproliferativen Effekte von IRF-1 entscheidend zur Reversion des transformierten Phänotyps beitragen. Um diese Hypothese zu prüfen sollten die antiproliferativen Effekte von IRF-1 genauer charakterisiert werden.

Ein Teil der Experimente wurde zusammen mit Michael Schaller im Rahmen seiner Diplomarbeit (Der Einfluss des „Interferon Regulatory Factor-1“ (IRF-1) auf den ZyklinE/CDK2-Inhibitor p27<sup>Kip1</sup>, TU Braunschweig, März 2007) durchgeführt und sind daher in beiden Arbeiten beschrieben.

### 2.2.1. Die Expression von IRF-1 führt zur Akkumulation transformierter Zellen in der G1 Phase

Unkontrolliertes Wachstum ist, neben dem Verlust der Kontaktinhibition, eine der wichtigsten Eigenschaften Onkogen-transformierter Zellen. IRF-1 wirkt Veränderungen entgegen, die den

transformierten Zellen ein unkontrolliertes Wachstum ermöglichen (Kirchhoff and Hauser, 1999; Kröger et al., 2003; Kröger et al., 2001). Daher sollte der Einfluss von IRF-1 auf die Proliferation transformierter myc/rasNIH3T3IH Zellen genauer charakterisiert werden. Zuerst wurde die zeitabhängige Veränderung der Zellzahl von transformierten Zellen bestimmt, in denen IRF-1 entweder inaktiv oder aktiv war (Abb.8A). Die transformierten Zellen in denen IRF-1 inaktiv war (-Dox -E2) zeigen ein exponentielles Wachstum. Im Gegensatz dazu verläuft der Anstieg der Zellen nahezu linear, wenn IRF-1 in den Zellen aktiviert (-Dox +E2) wurde. Da die Zellzahl nach IRF-1 Aktivierung nicht vollständig stagniert, muss zumindest ein Teil der Zellen proliferieren.

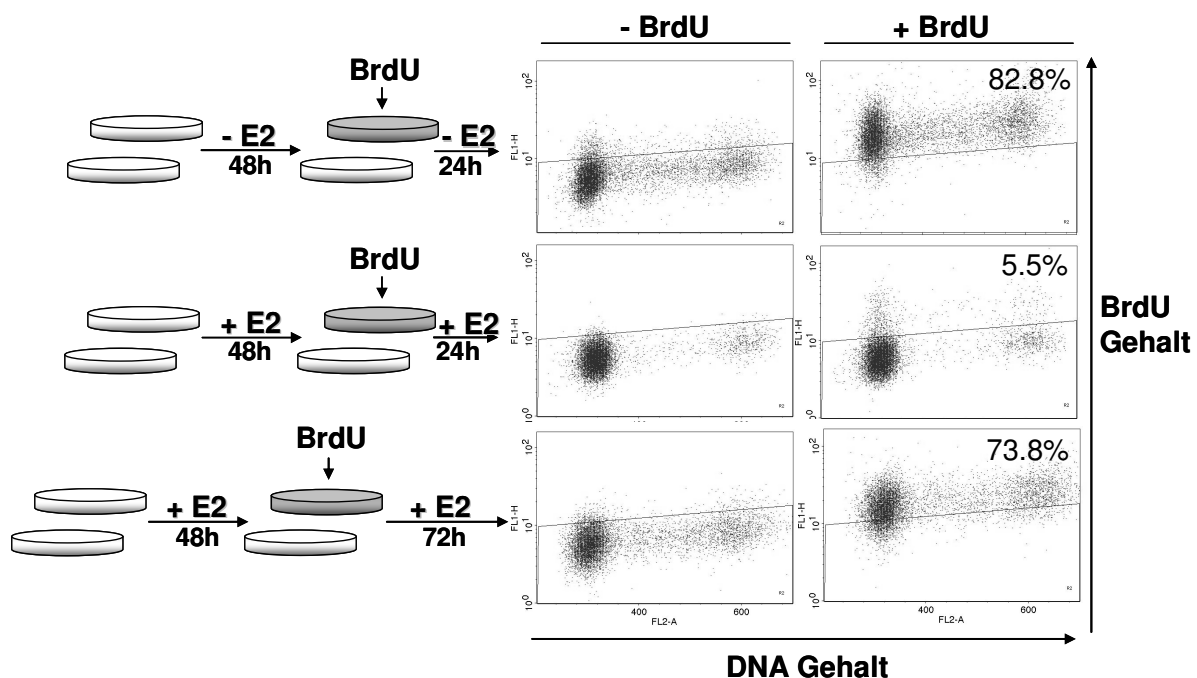


**Abb.8 Charakterisierung der antiproliferativen IRF-1 Effekte in transformierten Zellen**

Die antiproliferativen Effekte von IRF-1 wurden in transformierten myc/rasNIH3T3IH Zellen (-Dox), in denen IRF-1 entweder aktiv (+E2) oder inaktiv (-E2) war, untersucht. (A)  $2.5 \times 10^4$  Zellen pro  $9.1 \text{ cm}^2$  Platte wurden zum Zeitpunkt  $t_0$  ausgesät. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte nach 6h, 12h, 24h, 48h, 72h, und 96h. Gezeigt sind die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten mit Triplikaten pro Zeitpunkt und Induktion. (B) Zur Bestimmung der Verteilung auf die Zellzyklusphasen wurden die Zellen geerntet, permeabilisiert und mit Propidiumjodid (PI) gefärbt. Anschließend wurde der DNA Gehalt der Zellen im FACS analysiert.

Um zu bestimmen, in welcher Zellzyklusphase IRF-1 regulierend in die Proliferation der Zellen eingreift, wurde das Zellzyklusprofil der Zellen analysiert (Abb.8B). Dazu wurde die DNA der Zellen mit Propidiumjodid (PI) angefärbt und im FACS untersucht. 59% der transformierten Zellen befanden sich in der G1, 13% in der S und 26% in der G2/M Phase. Die Aktivierung von IRF-1 verändert die Zellverteilung auf die einzelnen Zellzyklusphasen, denn der Anteil von Zellen in der G1 Phase stieg von 59% auf 84%. Nur noch 15% der Zellen befanden sich in der S (3%) oder in der G2/M Phase (12%). Somit führt die Aktivierung von IRF-1 in c-myc/c-H-ras transformierten Zellen zu einer Akkumulation von Zellen in der G1 Phase.

Für die veränderte Proliferation und den erhöhten Anteil an Zellen in der G1 Phase gibt es zwei mögliche Erklärungen. (I) Ein Großteil der Zellen wird durch IRF-1 in der G1 Phase arretiert, während ein kleiner Teil der Zellen nicht auf die IRF-1 Aktivierung reagiert und weiter proliferiert. (II) Alle Zellen sind in der Lage zu proliferieren, aber sie benötigen nach der IRF-1 Aktivierung mehr Zeit um den G1 Checkpoint zu passieren. Um zu klären, welche der beiden Möglichkeiten zutrifft, wurde die Anzahl an replizierenden Zellen mittels Bromdesoxyuridin (BrdU) Inkorporation bestimmt (Abb.9). BrdU ist ein Thymidinanalogon und wird während der S-Phase in die DNA eingebaut. Auf diese Weise kann der Prozentsatz an Zellen bestimmt werden, der in einem definierten Zeitraum die S-Phase durchläuft. Für diesen Versuch wurden transformierte myc/rasNIH3T3IH Zellen, 48h nachdem IRF-1 aktiviert (+E2) wurde, in BrdU haltigem Medium kultiviert (Abb.9). Wie viele Zellen das BrdU in ihre DNA eingebaut hatten, wurde im FACS mit einem gegen BrdU gerichteten Antikörper bestimmt. Bereits 24h nach der BrdU Gabe konnte bei 82.8% der transformierten Zellen BrdU in der DNA nachgewiesen werden (Abb.9). Wurde IRF-1 vor der BrdU Gabe in den transformierten Zellen aktiviert, hatten innerhalb von 24h nur 5.5% der Zellen BrdU in ihre DNA eingebaut. Erfolgte die



**Abb.9 IRF-1 bewirkt eine Akkumulation transformierter Zellen in der G1 Phase**

Der Einfluss von IRF-1 auf die Anzahl an replizierenden Zellen wurde mittels Bromdesoxyuridin (BrdU) Inkorporation bestimmt. In den transformierten myc/rasNIH3T3IH Zellen wurde IRF-1 für 48h aktiviert (+E2). Anschließend hatten die Zellen 24h oder 72h Zeit um das BrdU in ihre DNA einzubauen (graue Platten). IRF-1 war auch während dieser Einbauphase aktiviert (+E2). Zellen, deren Medium kein BrdU enthielt, werden durch die hellen Platten symbolisiert. Die Anzahl an transformierten Zellen mit inaktiven IRF-1 (-E2), die innerhalb von 24h proliferieren, wurde ebenfalls bestimmt. Alle Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit einem gegen BrdU gerichteten Antikörper und mit PI angefärbt. Die Analyse der Zellen erfolgte im FACS. Das Histogramm zeigt den DNA Gehalt (X-Achse) und den BrdU Gehalt (Y-Achse) der Zellen.

Analyse der Zellen erst 72h nach der BrdU Gabe, stieg der Anteil an BrdU positiven Zellen auf 73.8%. Die Daten zeigen, dass der größte Teil der transformierten Zellen auch nach der Aktivierung von IRF-1 in der Lage ist zu proliferieren. Allerdings benötigen die Zellen mehr Zeit um den Zellzyklus zu durchlaufen. Die Aktivierung von IRF-1 führt somit nicht zu einem Zellzyklusarrest sondern zu einer verlängerten Verweilzeit der Zellen in der G1 Phase.

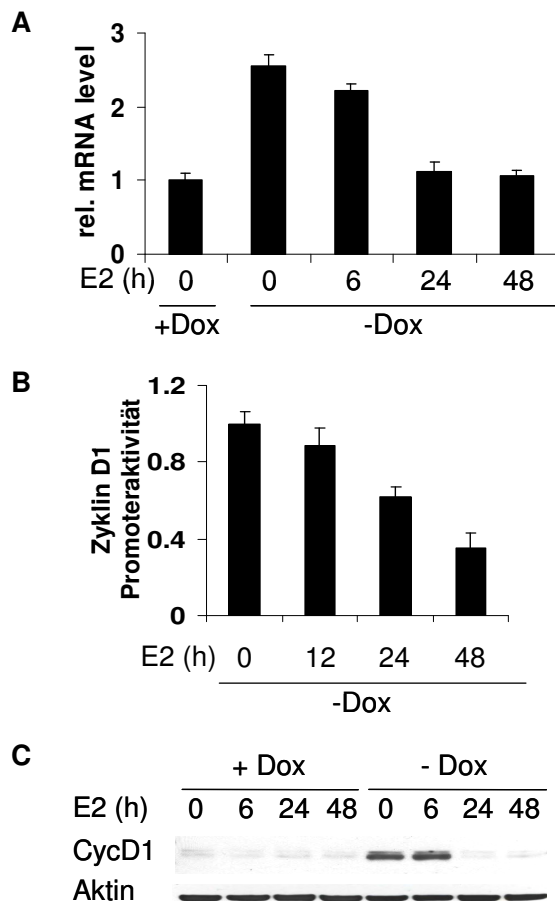
### **2.2.2. IRF-1 reduziert die Zyklin D1 Expression**

Die IRF-1 vermittelte Akkumulation von transformierten Zellen in der G1 Phase lenkte das Interesse auf Gene, deren Produkte den Übergang von der G1 in die S Phase kontrollieren. Dazu zählen die Komponenten der Zyklin D/CDK4/6 und Zyklin E/CDK2 Komplexe, aber auch ihre Inhibitoren wie p21 und p27. ZyklinD/CDK4(6) und ZyklinE/CDK2 phosphorylieren kooperativ den Tumorsuppressor pRB, wodurch die Inhibition des Transkriptionsfaktor E2F aufgehoben wird (Harbour and Dean, 2000; Ishida et al., 2001). Ohne die Induktion der E2F Zielgene ist es der Zelle nicht möglich, von der G1 in die S Phase zu gelangen. In Tabelle 2 sind Zellzyklus-regulierende Gene aufgeführt, deren Expression durch die Onkogene c-myc und c-Hras verändert und durch die Aktivierung von IRF-1 revertiert wird. Unter diesen Genen ist auch Zyklin D1 zu finden. Eine durch genetische Veränderungen bedingte Induktion der Zyklin D1 Konzentration führt zur Transformation (Hall and Peters, 1996; Sicinski et al., 1995) und wird mit der Entstehung humaner Tumore in Verbindung gebracht (Lee et al., 2000; Robles et al., 1996; Wang et al., 1994). Die Reduktion der Zyklin D1 Konzentration minimiert das tumorigene Potential von humanen Krebszelllinien und inhibiert deren Proliferation (Arber et al., 1997). Daher sollte geprüft werden, ob die IRF-1 vermittelte Normalisierung der erhöhten Zyklin D1 Expression in c-myc/c-H-ras transformierten Zellen für die antiproliferativen IRF-1 Effekte und die IRF-1 vermittelte Reversion des transformierten Phänotyps essentiell ist. Zuvor sollte der Einfluss von IRF-1 auf die Zyklin D1 Expression und auf Proteine die in der Signalkaskade oberhalb bzw. unterhalb von Zyklin D1 liegen analysiert werden.

Dazu wurden myc/rasNIH3T3IH Zellen mittels quantitativer RT-PCR (qRT-PCR) auf Veränderungen der Zyklin D1 mRNA Konzentrationen untersucht (Abb.10A). In Onkogen-transformierten Zellen (-Dox) war die Zyklin D1 mRNA Konzentration 2.5fach höher, als in nicht-transformierten (+Dox). Die Aktivierung von IRF-1 (+E2) reduzierte die Zyklin D1 mRNA Konzentration in den transformierten Zellen innerhalb von 24h auf das Niveau nicht-transformierter Zellen. Um herauszufinden, ob die Reduktion der mRNA Konzentration auf eine verringerte Transkription oder auf einen stärkeren Abbau der mRNA zurückzuführen ist,

wurden Reportergerananalysen durchgeführt (Abb.10B). Transformierte myc/rasNIH3T3IH Zellen wurden mit einem Vektor, in dem die Luziferase Expression durch den Zyklin D1 Promotor kontrolliert wird, transient transfiziert. Die Zyklin D1 Promotoraktivität sank innerhalb von 48h nach der Aktivierung von IRF-1 um 60%. Somit ist die Reduktion der durch c-myc und c-H-ras erhöhten Zyklin D1 mRNA Konzentration auf eine IRF-1 vermittelte Inhibition der ZyklinD1 Promotoraktivität zurückzuführen.

Mittels Western Blot Analysen wurde untersucht, ob die IRF-1 vermittelte Reduktion der Zyklin D1 Transkription zum Rückgang der Zyklin D1 Proteinkonzentration führt (Abb.10C). In den nicht-transformierten myc/rasNIH3T3IH Zellen (+Dox) ist die Zyklin D1 Proteinkonzentration sehr gering und wird durch die Aktivierung von IRF-1 (+E2) nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu führt die Expression der Onkogene c-myc und c-H-ras (-Dox) zu einem sehr starken Anstieg der Zyklin D1 Proteinkonzentration. Die Aktivierung von IRF-1 reduziert die Zyklin D1 Proteinkonzentration in transformierten Zellen innerhalb von 24h auf das Niveau von nicht-tansformierten. Diese Analysen zeigen, dass die IRF-1 vermittelte Reduktion der Zyklin D1 Promotoraktivität mit einer drastischen Reduktion der Zyklin D1 Proteinkonzentration korreliert.

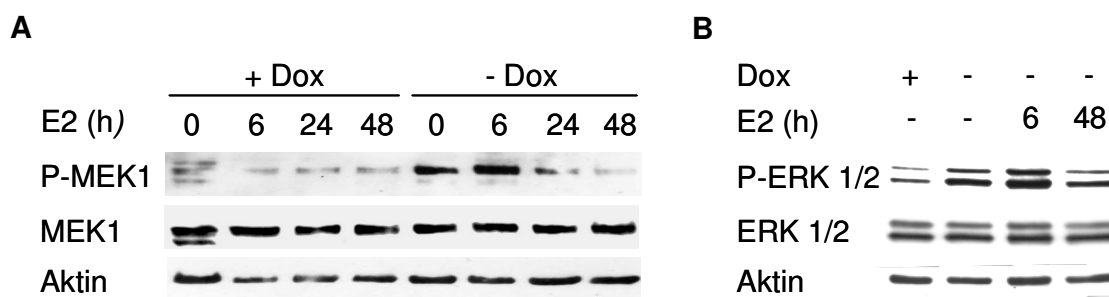


#### Abb.10 IRF-1 reduziert die Zyklin D1 Expression

Der Einfluss von IRF-1 auf die Zyklin D1 Expression wurde in myc/rasNIH3T3IH Zellen analysiert. Die Aktivierung von IRF-1 erfolgte für die angegebenen Zeitspannen durch Zugabe von Östradiol (+E2). (A) Änderungen der Viperin mRNA Konzentration wurden mittels qRT-PCR analysiert. Die mRNA Konzentration der Proben wurde über ihre Aktin mRNA Konzentrationen abgeglichen. Die Zyklin D1 mRNA Konzentration in nicht-transformierten Zellen (+Dox) in denen IRF-1 inaktiv war (-E2) wurde als 1 definiert. (B) Myc/rasNIH3T3IH Zellen wurden mit einem Zyklin D1-Promotor/Luziferase Konstrukt transient transfiziert. Die Luziferase Aktivität von Zellen in denen IRF-1 inaktiv war (-E2) wurde als 1 definiert. Die Aktivität des Zyklin D1 Promotors entspricht der Induktion der Luciferase Aktivität. Die Kotretransfektion eines Renilla Luziferase Vektors ermöglichte den Abgleich der Transfektionseffizienzen. Für drei unabhängige Experimente wurden jeweils Triplikate angefertigt. (C) Lysate von transformierten (-Dox) und nicht-transformierten (+Dox) myc/rasNIH3T3IH Zellen wurden mittels Western Blot Analysen auf ihre Zyklin D1 und Aktin Proteinkonzentrationen untersucht.

### 2.2.3. IRF-1 inaktiviert den MAPK Signalweg

Die IRF-1 vermittelte Reduktion der Zyklin D1 Transkription beginnt erst 24h nach der Aktivierung von IRF-1 (Abb.10), was vermuten lässt, dass IRF-1 den Zyklin D1 Promotor über einen indirekten Mechanismus reguliert. Daher sollte überprüft werden, ob IRF-1 Signalwege beeinflusst, die an der transkriptionellen Regulation des Zyklin D1 Genes beteiligt sind. Die Aktivierung des Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Signalweges, beispielsweise in Folge mitogener Stimulation, führt zur transkriptionellen Induktion der D Zykline (Musgrove et al., 1994; Xiong et al., 1993) und damit zur Initiation einer neuen Zellteilung. Somit wäre es möglich, dass die Reduktion der Zyklin D1 Promotoraktivität auf eine IRF-1 vermittelte Inaktivierung des MAPK Signalweges zurückzuführen ist. Auf Grund dieser Annahme wurde der Einfluss von IRF-1 auf die Aktivität der am MAPK Signalweg beteiligten Kinasen MEK und ERK1/2 mittels Western Blot Analysen untersucht (Abb.11A/B). In den nicht-transformierten myc/rasNIH3T3IH Zellen (+Dox) wurden nur geringe Konzentrationen der aktivierten (phosphorylierten) Form von MEK und ERK1/2 nachgewiesen. Die Expression der Onkogene c-myc und c-H-ras (-Dox) führt zur Aktivierung der beiden Kinasen. Infolge der IRF-1 Aktivierung (+E2) nimmt die Konzentration an phosphoryliertem MEK bzw. ERK1/2 drastisch ab. Da weder die Expression der Onkogene noch die Aktivierung von IRF-1 einen Einfluss auf die Gesamtproteinkonzentration von MEK und ERK1/2 haben, kann eine IRF-1 vermittelte Reduktion der Proteinkonzentrationen als Ursache für die Inaktivierung der beiden Kinasen ausgeschlossen werden. Vielmehr inhibiert IRF-1 die Aktivität des MAPK Signalweges indem es in der Signalkaskade oberhalb von MEK eingreift.

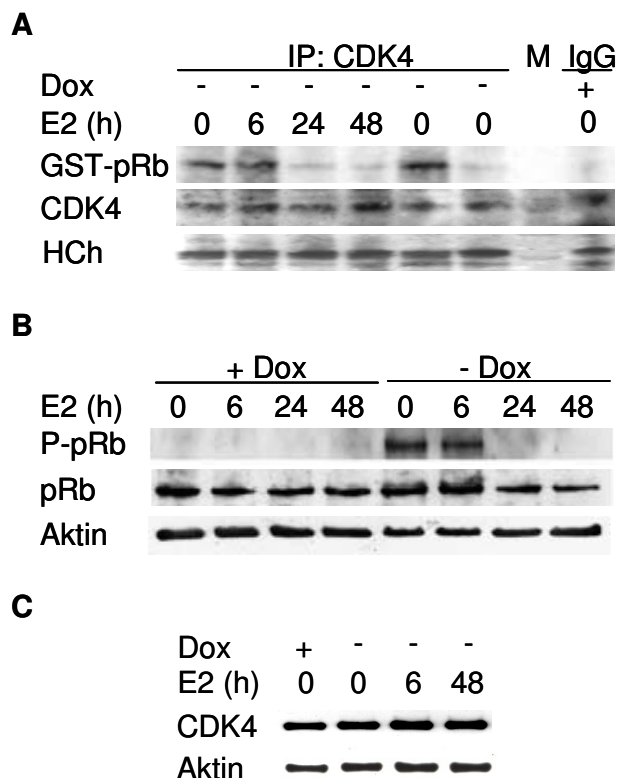


**Abb.11 IRF-1 inaktiviert den MAPK Signalweg in Onkogen-transformierten Zellen**

Myc/rasNIH3T3IH Zellen mit transformiertem (+Dox) und nicht-transformiertem (-Dox) Phänotyp wurden mittels Western Blot Analysen auf IRF-1 vermittelte Veränderungen der (A) MEK1 und (B) ERK1/2 Aktivität analysiert. Die Aktivierung von IRF-1 für die angegebenen Zeitspannen erfolgte durch Zugabe von Östradiol (+E2). In den Zelllysaten wurde die Konzentration der Gesamtproteinkonzentration von MEK1 und ERK1/2, die Konzentration der phosphorylierten (aktiven) MEK1 bzw. ERK1/2 Proteine (P-MEK1 und P-ERK1/2) und Aktin untersucht.

### 2.2.4. IRF-1 inhibiert die CDK4 Aktivität und reduziert die Phosphorylierung von pRB

Zyklin D1 ist die regulatorische Untereinheit der ZyklinD1/CDK4 Komplexe ohne deren Bindung die CDK4 Kinase inaktiv ist (Morgan, 1997; Murray, 2004). Die IRF-1 vermittelte Reduktion der Zyklin D1 Proteinkonzentration sollte daher zu einer signifikanten Abnahme der CDK4 Aktivität führen. Um zu untersuchen ob diese Annahme zutrifft, wurde CDK4 immunopräzipitiert und zusammen mit radioaktiv markiertem ATP ( $\gamma$ -[P<sup>32</sup>]-ATP) und einem künstlichen Substrat (GST-pRB) in einen Kinaseaktivitätstest eingesetzt (Abb.12A). Im Vergleich zu nicht-transformierten Zellen (+Dox) ist die CDK4 Kinaseaktivität in den myc/ras transformierten Zellen (-Dox) sehr stark erhöht. Die Aktivierung von IRF-1 (+E2) in Zellen mit einem transformiertem Phänotyp führt innerhalb von 24h zu einer drastischen Abnahme der Kinaseaktivität. Zu diesem Zeitpunkt ist die Zyklin D1 Proteinkonzentration auf Grund der IRF-1 Aktivität sehr gering (Abb.10C). Es ist wahrscheinlich, dass in Folge des IRF-1 vermittelten Zyklin D1 Mangels nur wenige ZyklinD/CDK4 Komplexe ausgebildet werden, weswegen nur ein geringer Teil der CDK4 Kinasen im aktivierten Zustand vorliegt. Da die CDK4 Proteinkonzentration weder durch die Expression der Onkogene (c-myc, c-H-ras) noch durch die Aktivierung von IRF-1 beeinflusst wird (Abb.12C), kann eine IRF-1 vermittelte Reduktion der CDK4 Proteinkonzentration als Ursache für die Reduktion der Kinaseaktivität ausgeschlossen werden.



**Abb.12 IRF-1 inhibiert die CDK4 Kinaseaktivität**

Myc/rasNIH3T3IH Zellen wurden im transformierten (-Dox) und nicht-transformierten (+Dox) Zustand analysiert. Die Aktivierung von IRF-1 erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten durch Zugabe von Östrogen (+E2). Hier dargestellt sind die Ergebnisse jeweils eines repräsentativen Experiments. (A) CDK4 und die daran assoziierten Proteine wurden mittels eines gegen CDK4 gerichteten Antikörpers immunpräzipitiert (IP). Ein unspezifischer Antikörper (IgG) diente als Kontrolle. Die Präzipitate wurden zusammen mit  $\gamma$ -[P<sup>32</sup>]-ATP und dem künstlichen Substrat GST-pRb in einen Kinaseaktivitätstest eingesetzt. Die Detektion des phosphorylierten Substrats erfolgte mittels Autoradiographie. Die schwere Kette (HCh) der Antikörper und die CDK4 Proteinkonzentration dienten als Ladekontrolle. (B) Zelllysate wurden auf die Konzentration der phosphorylierten (aktiven) Form von pRb (P-pRb) und auf die Gesamtproteinkonzentration von pRb und Aktin untersucht. (C) Die Zelllysate wurden ebenfalls auf ihre CDK4 und Aktin Proteinkonzentrationen untersucht.



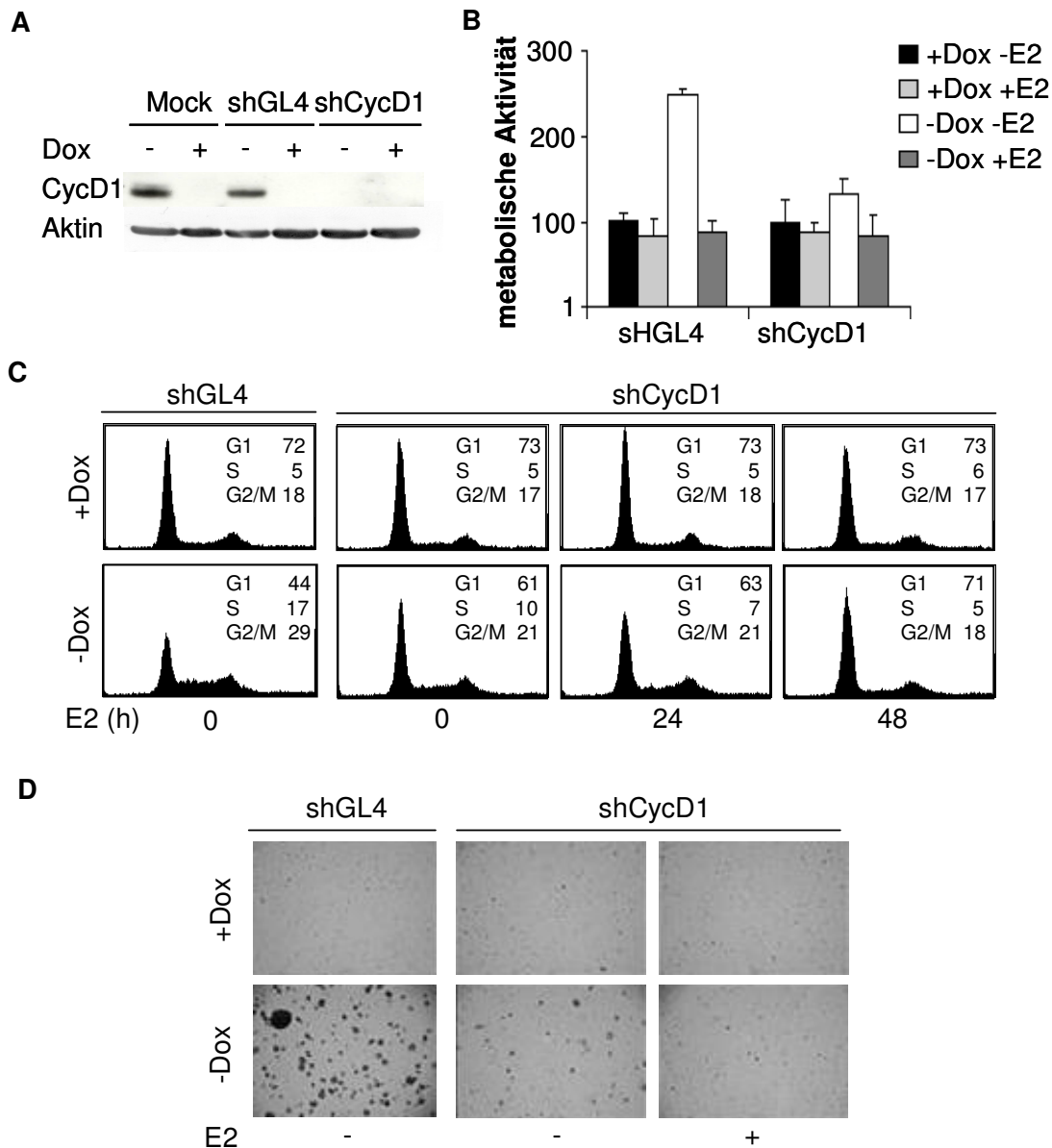
Das einzige bekannte Substrat der ZyklinD/CDK4 Komplexe ist der Tumorsuppressor pRB (Sherr, 2004). Eine drastische Reduktion der CDK4 Aktivität, wie die nach der Aktivierung von IRF-1, sollte Auswirkungen auf die Phosphorylierung des pRB Proteins haben. Aus diesem Grund wurden myc/rasNIH3T3IH Zellen mittels Western Blot Analysen auf IRF-1 vermittelte Veränderungen der pRB Phosphorylierung untersucht (Abb.12D). In den nicht-transformierten myc/rasNIH3T3IH Zellen (+Dox) ist die Proteinkonzentration der phosphorylierten Form von pRB (P-pRb) sehr gering und wird durch die Aktivierung von IRF-1 (+E2) nicht beeinflusst. Die Expression der Onkogene c-myc und c-H-ras (-Dox) führt zu einem starken Anstieg der P-pRb Konzentration. Die Aktivierung von IRF-1 reduziert die P-pRb Proteinkonzentration in den transformierten Zellen innerhalb von 24h auf das Niveau von nicht-transformierten Zellen. Weder die Expression der Onkogene, noch die Aktivierung von IRF-1 haben einen Einfluss auf die Gesamtproteinkonzentration von pRb. Dies zeigt, dass die IRF-1 vermittelte Reduktion der Phosphorylierung von pRb nicht auf Veränderungen der pRB Proteinkonzentration zurückzuführen ist. Somit ist gezeigt, dass die IRF-1 vermittelte Reduktion der Zyklin D1 Proteinkonzentration zu einer Reduktion von aktiven ZyklinD1/CDK4 Komplexen führt, weswegen nur wenige pRb Proteine CDK4 abhängig phosphoryliert werden.

#### **2.2.5. Die Reduktion der endogenen Zyklin D1 Konzentration simuliert die antiproliferativen Effekte von IRF-1 in transformierten Zellen**

Auf Grund der im Kapitel 2.2.4. aufgeführten Daten wurde vermutet, dass IRF-1 über die Reduktion der in myc/ras transformierten Zellen erhöhten Zyklin D1 Expression, die Akkumulation in der G1 Phase und damit die Reversion des transformierten Phänotyps vermittelt. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden myc/rasNIH3T3IH Zellen, in denen die IRF-1 vermittelte Reduktion der Zyklin D1 Proteinkonzentration durch die Expression von short-hairpin (sh) RNAs simuliert wurde, analysiert. Die Zellen wurden mit Lentiviren, welche gegen Zyklin D1 (shCycD1) oder gegen unspezifische Zielsequenzen (shGL4) gerichtete shRNAs exprimieren, infiziert. Die Effizienz der shRNAs wurde mittels Western Blot Analysen untersucht (Abb.13A). Die unspezifische shRNA hatte keinen Einfluss auf die Zyklin D1 Proteinkonzentration. Im Gegensatz dazu wurde die Konzentration des Zyklin D1 Proteins durch die gegen Zyklin D1 gerichtete shRNA drastisch gesenkt und war somit funktionell.

Im Folgenden wurde untersucht, welchen Einfluss die Reduktion der endogenen Zyklin D1 Proteine auf die metabolische Aktivität der transformierten myc/rasNIH3T3IH Zellen hat (Abb.13B). Kontrollzellen welche die unspezifische shRNA exprimieren (shGL4) besaßen im

transformierten Zustand (-Dox) eine 2.5fach höhere metabolische Aktivität, als Zellen im nicht-transformierten Zustand (+Dox). In transformierten Zellen führte die Aktivierung von IRF-1 (+E2) zur Reduktion der metabolischen Aktivität, auf das Niveau von nicht-



**Abb.13 Die Reduktion von Zykin D1 ist essentiell für die antiproliferativen IRF-1 Effekte**

Myc/rasNIH3T3IH Zellen wurden mit Lentiviren, die eine Zykin D1 shRNA (shCycD1) exprimieren, infiziert. Die Kontrollzellen wurden mit einem Lentivirus infiziert, dessen Expressionskassette für eine unspezifische shRNA (shGL4) kodiert. IRF-1 wurde in transformierten (-Dox) und nicht-transformierten (+Dox) Zellen durch die Zugabe von Östradiol aktiviert (+E2). (A) Nicht-infizierte (Mock) und shRNA exprimierende Zellen (shGL4; shCycD1) wurden in Western Blot Analysen auf ihre Zykin D1 und Aktin Proteinkonzentrationen untersucht. (B) Die Proliferation wurde durch Messung der metabolischen Aktivität im WST Test bestimmt. Die metabolische Aktivität von nicht-transformierten Zellen (+Dox) wurde als 1 definiert. (C) Für die Zellzyklusanalyse wurden die Zellen fixiert, ihre DNA mit PI angefärbt und im FACS analysiert. (D) Die Untersuchung des kontakt-unabhängigen Wachstums myc/ras-transformierter NIH3T3IH-Zellen im Weichagar. Die Fotos zeigen Weichagarklone von Platten nach zweiwöchiger Inkubation.

Transformierten Zellen. Im Gegensatz dazu ist die metabolische Aktivität in Zellen deren Zyklin D1 Proteinkonzentration durch die shRNA reduziert wurde gleich bleibend, unabhängig davon ob die Onkogene exprimiert (-Dox) werden oder IRF-1 aktiv ist (+E2). Die metabolische Aktivität in den shCycD1 exprimierenden, transformierten Zellen ist ähnlich hoch wie in transformierten shGL4 exprimierenden Zellen, in denen IRF-1 aktiv war. Somit kommt es durch die Reduktion der Zyklin D1 Proteinkonzentration zu ähnlichen Effekten auf die metabolische Aktivität transformierter Zellen wie durch IRF-1.

Da die Aktivierung von IRF-1 zu einer Akkumulation von transformierten Zellen in der G1 Phase führt (Abb.8/9), wurden myc/rasNIH3T3IH Zellen, deren Zyklin D1 Proteinkonzentration mittels shRNAs gesenkt war, auf ihre Zellzyklusphasenverteilung untersucht (Abb.13C). 44% der transformierten (-Dox), mit Kontrollviren (shGL4) infizierten Zellen befinden sich in der G1 Phase. Im Gegensatz dazu befinden sich bei transformierten Zellen, die mit der Zyklin D1 shRNA infiziert sind, 61% der Zellen in der G1 Phase. Somit führt die Reduktion der Zyklin D1 Proteinkonzentration zu einer Akkumulation von Zellen in der G1 Phase. Derselbe Effekt wurde in transformierten myc/rasNIH3T3IH Zellen in denen IRF-1 aktiv war beobachtet (Abb. 8). Auch wenn die endogene Zyklin D1 Konzentration mittels shRNA gesenkt wurde, führt die Aktivierung von IRF-1 zur Akkumulation von Zellen in der G1 Phase. Somit muss es mindestens einen weiteren IRF-1 regulierten Mechanismus geben der Zyklin D1 unabhängige, Zellzyklus-regulierende Effekte vermittelt.

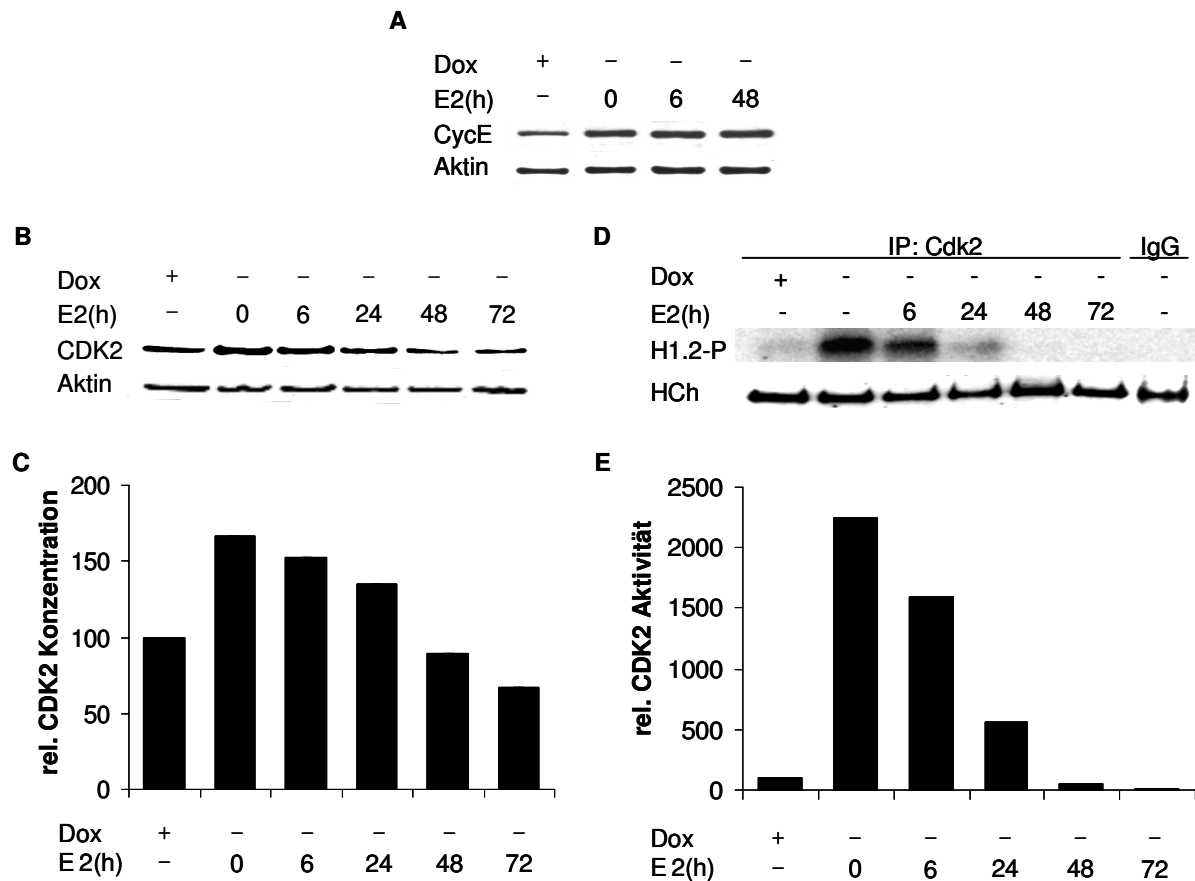
Des Weiteren sollte festgestellt werden, ob die IRF-1 vermittelte Reduktion von Zyklin D1 für die Reversion der Transformation essentiell ist. Da Kontakt unabhängiges Wachstum ein wichtiges Kriterium zur Charakterisierung transformierter Zellen darstellt, wurde das Wachstum von shRNA exprimierenden Zellen im Weichagartest untersucht. Die Anzahl an Kolonien ist in den transformierten (-Dox), shCycD1 exprimierenden Zellen 10 Mal höher als in den entsprechenden Kontrollzellen (shGL4; -Dox). Damit ist gezeigt, dass IRF-1 die Akkumulation von Zellen in der G1 Phase und damit die Reversion des transformierten Phänotyps über die Reduktion der in myc/ras transformierten Zellen erhöhten Zyklin D1 Expression vermittelt.

#### **2.2.6. IRF-1 verringert Proteinkonzentration und Kinaseaktivität von CDK2**

In c-myc/c-H-ras transformierten Zellen ist die Normalisierung der erhöhten Zyklin D1 Expression entscheidend für die antiproliferativen und tumorsuppressiven Effekte von IRF-1 (Abb.13). Beobachtungen in myc/rasNIH3T3IH Zellen, in denen das Zyklin D1 Protein durch shRNAs fast vollständig eliminiert wurde haben aber auch gezeigt, dass es neben der

Regulation von Zyklin D1 noch weitere IRF-1 induzierte, antiproliferative Mechanismen geben muss, die an der Reversion des transformierten Phänotyps beteiligt sind (Abb.13). Diese sind zwar in den myc/rasNIH3T3IH Zellen von untergeordneter Bedeutung, sie könnten aber in Zellen, in denen die Expression von Zyklin D1 nicht durch IRF-1 reguliert wird, für die IRF-1 vermittelte Proliferationsinhibition und die daraus resultierende Reversion des transformierten Phänotyps verantwortlich sein.

Neben den ZyklinD/CDK4(6) Komplexen sind auch die ZyklinE/CDK2 Komplexe für den Übergang von der G1 zur S Phase von Bedeutung. Es wäre denkbar, dass IRF-1 die Aktivität des ZyklinE/CDK2 Komplexes beeinflusst und damit zum Stopp des unkontrollierten Wachstums transformierter Zellen beiträgt. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von IRF-1 auf die Zyklin E und die CDK2 Proteinkonzentration mittels Western Blot Analysen untersucht (Abb.14). Dabei zeigte sich, dass die Zyklin E Proteinkonzentration weder durch die Expression der Onkogene (c-myc, c-H-ras) noch durch die Aktivierung von IRF-1 beeinflusst wird (Abb.14A). Die CDK2 Konzentration in transformierten Zellen (-Dox) war gegenüber nicht-transformierten (+Dox) um das 1.6fache erhöht (Abb.14B/C). In den transformierten Zellen führt die Aktivierung von IRF-1 (+E2) zur Abnahme des CDK2 Proteins. Nach 48h Stunden ist die CDK2 Konzentration vergleichbar mit der Proteinkonzentration in nicht-transformierten Zellen. Somit führt die Aktivierung von IRF-1 in transformierten Zellen zur Normalisierung der CDK2 Proteinkonzentration. CDK2 ist die katalytische Untereinheit des ZyklinE/CDK2 Komplexes. Daher wurde untersucht, ob die IRF-1 vermittelte Reduktion der CDK2 Proteinmenge mit einer Reduktion der Kinaseaktivität verbunden ist. Dazu wurde CDK2 aus Extrakten von myc/rasNIH3T3IH Zellen immunpräzipitiert und zusammen mit radioaktiv markiertem ATP ( $\gamma$ -[P<sup>32</sup>]-ATP) und einem künstlichen Substrat (Histon H1.2) in einen Kinaseaktivitätstest eingesetzt (Abb.14D/E). Die Kinaseaktivität in transformierten Zellen (-Dox) war um das 20fache höher als bei nicht-transformierten Zellen (+Dox). Bereits 6h nach der Aktivierung von IRF-1 (+E2) war die CDK2 Kinaseaktivität in den transformierten Zellen um 30% reduziert. Nach 48h Stunden war die Aktivität vergleichbar hoch wie in nicht-transformierten Zellen. Diese Daten zeigen, dass die Aktivierung von IRF-1 die CDK2 Kinaseaktivität in transformierten Zellen drastisch reduziert. Die IRF-1 vermittelte Abnahme der CDK2 Proteinkonzentration tritt im Vergleich dazu zeitlich verzögert auf und fällt wesentlich geringer aus. Aus diesem Grund kann die Reduktion der CDK2 Proteinkonzentration als Ursache für die reduzierte Kinaseaktivität ausgeschlossen werden.



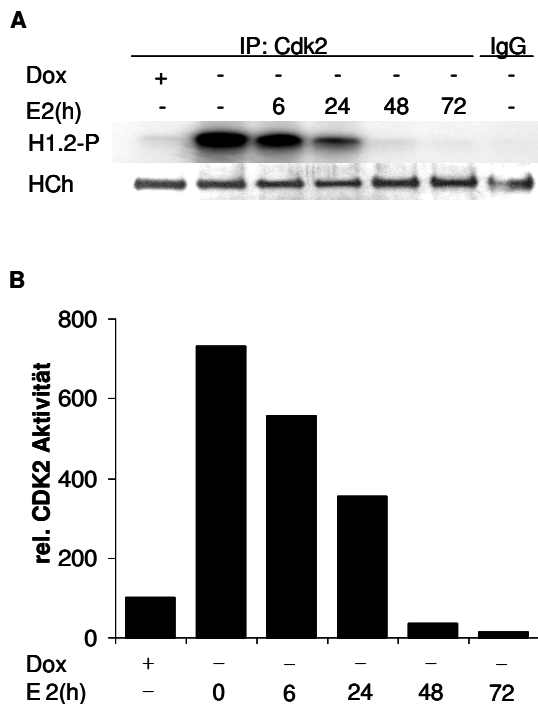
**Abb.14 IRF-1 reduziert die Proteinmenge und die Kinaseaktivität von CDK2**

In transformierten (-Dox) und nicht-transformierten (+Dox) myc/rasNIH3T3IH Zellen wurden die Zyklin E und die CDK2 Proteinkonzentration, sowie die CDK2 Kinaseaktivität bestimmt. Die Aktivierung von IRF-1 erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten mittels Östrogen (+E2). Hier dargestellt sind die Ergebnisse eines von mind. zwei unabhängigen Experimenten. **(A)** Die Zelllysate wurden in Western Blot Analysen auf ihre Zyklin E und Aktin Proteinkonzentrationen untersucht. **(B)** Außerdem wurden die Zelllysate auf ihre CDK2 und Aktin Proteinkonzentrationen untersucht. **(C)** Die Intensität der CDK2 Proteinbanden wurden mit dem Programm ImageQuant gegen die Intensität der Aktin-Banden abgeglichen und graphisch dargestellt. **(D)** CDK2 und die daran assoziierten Proteine wurden mittels eines gegen CDK2 gerichteten Antikörpers immunpräzipitiert (IP). Ein unspezifischer Antikörper (IgG) diente als Kontrolle. Die Präzipitate wurden zusammen mit  $\gamma$ -[P<sup>32</sup>]-ATP und dem künstlichen Substrat Histon H1.2 für einen Kinaseaktivitätstest eingesetzt. Die Detektion des phosphorylierten H1.2 (H1.2-P) erfolgte mittels Autoradiographie. Die schwere Kette (HCh) der Antikörper diente als Ladekontrolle. **(E)** Die Intensität der H1.2-P Bande wurde mit dem Programm ImageQuant gegen die Intensität der HCh Bande abgeglichen und graphisch dargestellt.

### 2.2.7. Die Reduktion der CDK2 Kinaseaktivität ist unabhängig von der Zyklin D1 Regulation

Der ZyklinD1/CDK4 Komplex kann mit dem CDK2 Inhibitor p27 katalytisch aktive Komplexe ausbilden (LaBaer et al., 1997). Die Aktivierung von IRF-1 führt zur Reduktion von Zyklin D1 (Abb.10), wodurch es zur Freisetzung von ZyklinD/CDK4 gebundenem p27 kommt. Das frei gewordene p27 könnte CDK2 binden und dessen Funktion inhibieren. Daher sollte untersucht werden, ob die IRF-1 vermittelte Reduktion der Zyklin D1 Proteinkonzentration, über die Erhöhung von frei vorliegendem p27, zur Inhibition der CDK2 Kinaseaktivität führt. Hierfür

wurde die CDK2 Aktivität in myc/rasNIH3T3IH Zellen, die Zyklin D1 konstitutiv überexprimieren, untersucht. CDK2 wurde aus den Zellextrakten immunpräzipitiert und zusammen mit radioaktiv markiertem ATP ( $\gamma$ -[P<sup>32</sup>]-ATP) und dem künstlichen Substrat Histon H1.2 in einen Kinaseaktivitätstest eingesetzt (Abb.15). Die Kinaseaktivität in transformierten Zellen (-Dox) war um das 8fache höher als in nicht-transformierten Zellen (+Dox). Bereits 24h nach der Aktivierung von IRF-1 (+E2) war die CDK2 Kinaseaktivität auf die Hälfte gesunken. Nach 48h Stunden war die Aktivität geringer als in nicht-transformierten Zellen (+Dox). Da die Aktivierung von IRF-1 in diesen Zellen keinen Einfluss auf die erhöhte Zyklin D1 Proteinkonzentration hat (Kröger et al., 2007), muss die IRF-1 vermittelte Reduktion der CDK2 Kinaseaktivität unabhängig von der Reduktion des Zyklin D1 Proteins erfolgen.

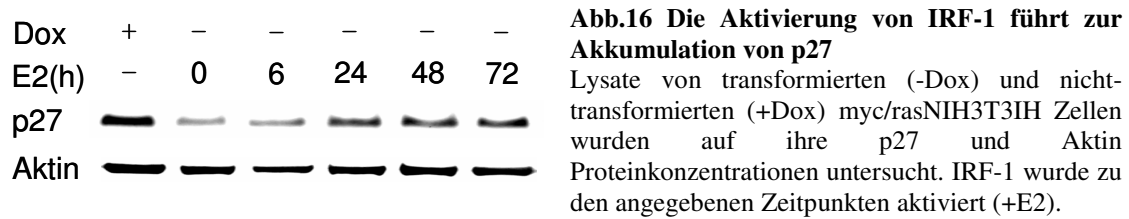


**Abb.15 IRF-1 inhibiert die CDK2 Kinaseaktivität unabhängig von Zyklin D1**

IRF-1 wurde in Zyklin D1 überexprimierenden myc/rasNIH3T3IH Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten aktiviert (+E2). Die Zellen wurden im transformierten (-Dox) und im nicht-transformierten Zustand (+Dox) untersucht. **(A)** CDK2 wurde mittels eines gegen CDK2 gerichteten Antikörpers immunpräzipitiert (IP). Ein unspezifischer Antikörper (IgG) diente als Kontrolle. Die Präzipitate wurden zusammen mit  $\gamma$ -[P<sup>32</sup>]-ATP und dem künstlichen Substrat Histon H1.2 für einen Kinaseaktivitätstest eingesetzt. Die Detektion von H1.2-P erfolgte mittels Autoradiographie. Die schwere Kette (HCh) des Antikörpers diente als Ladekontrolle. **(B)** Die Intensität der H1.2-P Bande wurde mit dem Programm ImageQuant gegen die Intensität der schweren Kette des Antikörpers (HCh) Bande abgeglichen und graphisch dargestellt.

### 2.2.8. Die Aktivierung von IRF-1 führt zur Akkumulation von p27

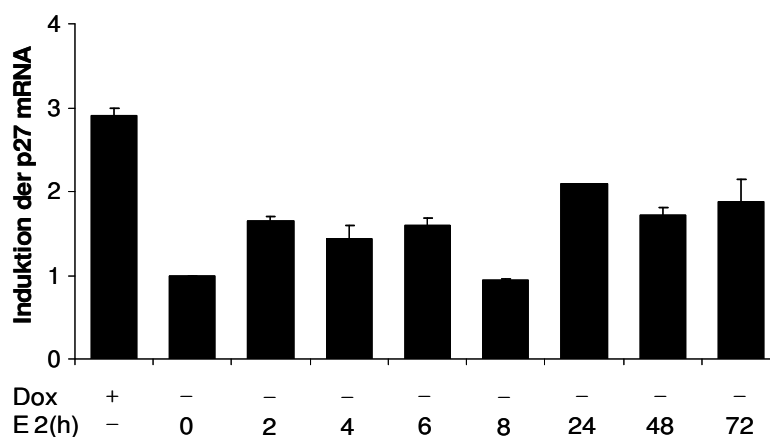
Im Verlauf des Zellzyklus wird die Aktivität von CDK2 durch den Inhibitor p27 reguliert (Russo et al., 1996). IRF-1 könnte die CDK2 Kinaseaktivität reduzieren indem es die Konzentration des p27 Proteins erhöht. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde der Einfluss von IRF-1 auf die p27 Proteinkonzentration in myc/rasNIH3T3IH Zellen untersucht (Abb.16). Im nicht-transformierten Zustand der Zellen (+Dox) konnten hohe Konzentrationen des p27 Proteins nachgewiesen werden. Die Expression der Onkogene c-myc und c-H-ras (-Dox) reduzierte die p27 Proteinkonzentration um 40%. Im Gegensatz dazu, bewirkte die Aktivierung



Von IRF-1 (+E2) in den transformierten Zellen eine zeitabhängige Akkumulation des p27 Proteins. Somit ist gezeigt, dass IRF-1 die p27 Proteinkonzentration in den transformierten Zellen erhöht. Eine damit verbundene Inhibition der ZyklinE/CDK2-Komplexe könnte der Grund für die Akkumulation von transformierten Zellen in der G1 Phase des Zellzyklus sein.

### 2.2.8.1. IRF-1 hat keinen Einfluss auf die p27 mRNA Konzentration

Die Aktivierung von IRF-1 führt in transformierten Zellen zur Akkumulation von p27 (Abb.16). Da IRF-1 ein transkriptioneller Aktivator ist wäre es möglich, dass IRF-1 die Transkription des p27 Genes reguliert. Dies sollte zu einer Erhöhung der p27 mRNA Konzentration führen. Daher wurde der Einfluss von IRF-1 auf die p27 Expression mittels qRT-PCR untersucht (Abb.17). Transformierte Zellen (-Dox) besitzen nur ein Drittel der p27 mRNA Menge im Vergleich zu nicht-transformierten Zellen (+Dox). Nach der Aktivierung von IRF-1 (+E2) traten in den transformierten Zellen leichte Schwankungen der p27 mRNA Konzentration auf. Eine deutliche Induktion der p27 mRNA zeichnete sich aber nicht ab. Die Daten wurden mittels Northern Blot Analyse verifiziert. Auch hier konnte keine Veränderung



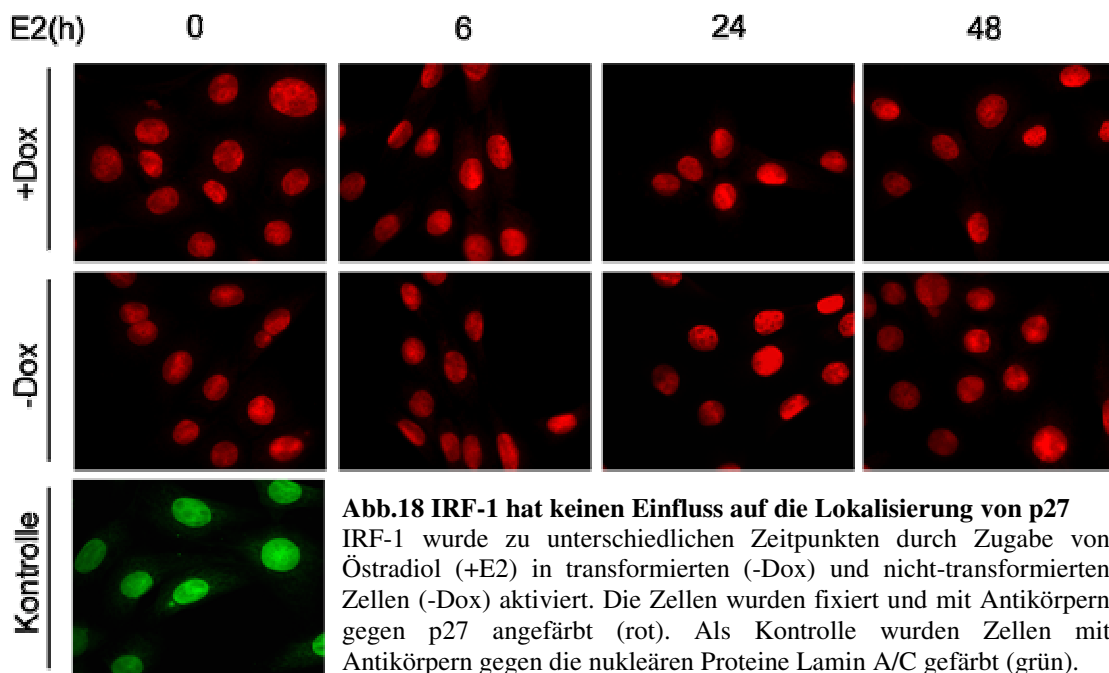
### Abb.17 IRF-1 hat keinen signifikanten Einfluss auf die p27 mRNA Konzentration

In transformierten (-Dox) und nicht-transformierten (+Dox) myc/rasNIH3T3IH Zellen wurde die Veränderung der p27 mRNA Konzentrationen mittels qRT-PCR untersucht. IRF-1 wurde zu den angegebenen Zeitpunkten aktiviert (+E2). Die mRNA Konzentrationen der Proben wurden über ihre Aktin mRNA Konzentrationen untereinander abgeglichen. Die p27 mRNA Konzentration in transformierten Zellen in denen IRF-1 inaktiv war wurde als 1 definiert.

Der p27 mRNA Konzentration nach Aktivierung von IRF-1 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Das lässt vermuten, dass die Transkription von p27 durch IRF-1 nicht signifikant beeinflusst wird.

#### 2.2.8.2. IRF-1 hat keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisierung von p27

Im p27 Protein konnten zwei Phosphorylierungsstellen, über die die subzelluläre Lokalisierung von p27 gesteuert wird, identifiziert werden. Sowohl die Phosphorylierung von Threonin-157 durch AKT/PKB (Shin et al., 2002; Viglietto et al., 2002b; Vlach et al., 1997), als auch die Phosphorylierung von Serin-10 durch KIS (Boehm et al., 2002) bewirken den Export des Proteins in das Zytoplasma. Dies führt zur dauerhaften Aktivierung der ZyklinE/CDK2 Komplexe und damit zur unkontrollierten Zellteilung. Falls p27 im Zytoplasma der transformierten Zellen lokalisiert ist, könnte IRF-1 die Relokalisierung von p27 bewirken und damit das unkontrollierte Wachstum der Zellen hemmen. Mittels Immunfluoreszenz Analysen wurde überprüft, ob IRF-1 die Lokalisierung des p27 Proteins beeinflusst (Abb.18). Sowohl in den nicht-transformierten (+Dox), als auch in den transformierten Zellen (-Dox) war p27 im Zellkern lokalisiert. Auch nach der Aktivierung von IRF-1 konnte im Zytoplasma der Zellen kein p27 nachgewiesen werden. Somit hat weder die Transformation der Zellen noch die Aktivierung von IRF-1 einen Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisierung von p27.

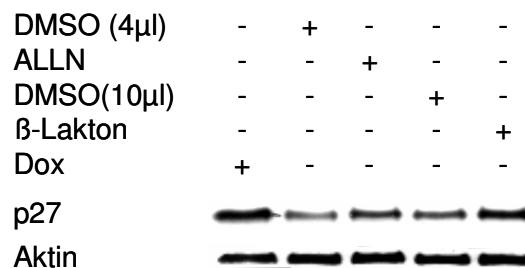


**Abb.18 IRF-1 hat keinen Einfluss auf die Lokalisierung von p27**  
IRF-1 wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch Zugabe von Östradiol (+E2) in transformierten (-Dox) und nicht-transformierten Zellen (-Dox) aktiviert. Die Zellen wurden fixiert und mit Antikörpern gegen p27 angefärbt (rot). Als Kontrolle wurden Zellen mit Antikörpern gegen die nukleären Proteine Lamin A/C gefärbt (grün).



### 2.2.8.3. IRF-1 erhöht die Stabilität des p27 Proteins

Neben der Proteinlokalisierung wird auch die Proteininstabilität von p27 durch post-translationale Modifikationen beeinflusst. Die p27 Proteinkonzentration ist bei seneszenten Zellen und bei Zellen in der frühen G1 Phase am höchsten (Nourse et al., 1994; Reynisdottir et al., 1995). Da der ZyklinE/CDK2 Komplex nur in der Abwesenheit von p27 aktiviert werden kann, ist der Abbau des CDK2 Inhibitors p27 für den Übergang von der G1 in die S Phase essentiell. Dieser Abbau erfolgt am Ende der G1 Phase durch 26S Proteasomen. Es stellte sich die Frage, ob die IRF-1 vermittelte Akkumulation von p27 auf einen verringerten Abbau zurückzuführen ist. Um zu zeigen, dass p27 in den Zellen proteosomal degradiert wird, wurde das Proteasom durch N-Acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO (ALLN) und *clasto*-Lactacystin- $\beta$ -Lactone ( $\beta$ -Lakton) inhibiert. In transformierten Zellen (-Dox) führte sowohl die Behandlung mit ALLN als auch die Behandlung mit  $\beta$ -Lakton zu einem Anstieg der p27 Proteinkonzentration (Abb.19), wobei die Inhibition mit  $\beta$ -Lakton effektiver als die mit ALLN war. In nicht-transformierten Zellen haben die beiden Inhibitoren keinen Einfluss auf die p27 Konzentration (Daten nicht gezeigt). Demzufolge ist die geringere p27 Proteinkonzentration in den transformierten Zellen auf einen verstärkten proteolytischen Abbau zurückzuführen.



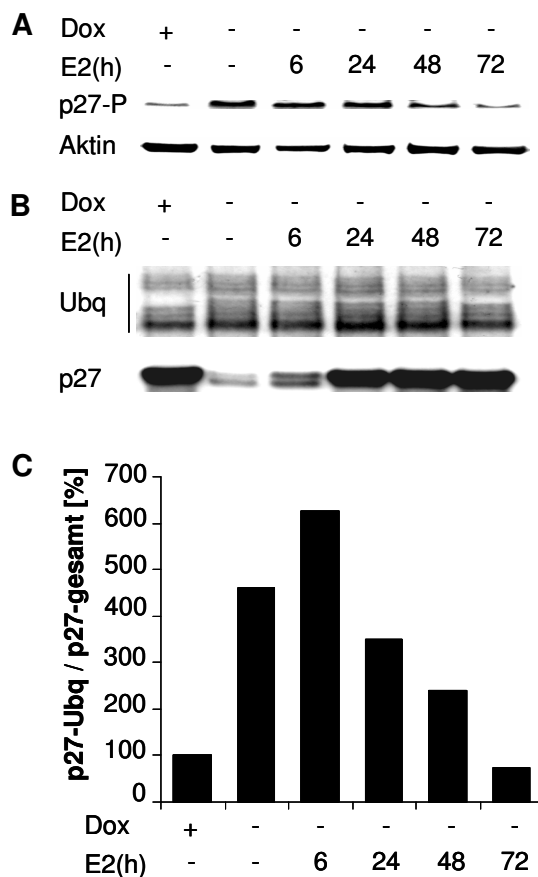
**Abb.19 p27 wird in transformierten Zellen proteosomal abgebaut**

Der proteasomabhängige Abbau von p27 wurde in myc/ras-transformierten NIH3T3IH-Zellen untersucht. Dazu wurde die Proteasomenaktivität durch Zugabe von 50  $\mu$ mol/l N-Acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO (ALLN) bzw. 12.5  $\mu$ mol/l clasto-Lactacystin- $\beta$ -Lactone ( $\beta$ -Lakton) in transformierten (-Dox) myc/rasNIH3T3IH Zellen inhibiert. Nicht-transformierte Zellen (+Dox) dienten als Kontrolle. Die beiden Inhibitoren mussten in unterschiedlichen DMSO Volumina gelöst werden, da DMSO einen konzentrationsabhängigen Einfluss auf die Expression verschiedener Proteine hat. Daher wurde für jeden Inhibitor eine separate DMSO Kontrolle verwendet. Die Zelllysate wurden mittels Western Blot Analysen auf ihre p27 und Aktin Proteinkonzentrationen untersucht.

Die Phosphorylierung von Threonin-187 durch den ZyklinE/CDK2-Komplex (Vlach et al., 1997) markiert p27 für den proteolytischen Abbau. Die T187-phosphorylierten p27 Proteine werden durch den E3 Ligase Komplex SCF<sup>SKP2</sup> erkannt, ubiquitinyliert und anschließend durch Proteasomen abgebaut (Ungermannova et al., 2005). Die IRF-1 vermittelte Reduktion der CDK2 Kinaseaktivität könnte zu einer verringerten Phosphorylierung und damit zu einem verringerten Abbau des p27 Proteins führen. Daher wurde p27 auf Veränderungen im

Phosphorylierungsstatus des Threoninrest-187 untersucht (Abb.20A). In den nicht-transformierten Zellen (+Dox) war die Konzentration an T187 phosphoryliertem p27 (p27-P) viel geringer als in den transformierten Zellen (-Dox). Die Aktivierung von IRF-1 (+E2) führte in transformierten Zellen zur Abnahme der T187 Phosphorylierung (Abb.20A). In nicht-transformierten Zellen (+Dox) hatte die Aktivierung von IRF-1 keine Auswirkung auf die Phosphorylierung des p27 Proteins (Daten nicht gezeigt). Somit korreliert die IRF-1 vermittelte Reduktion der CDK2 Kinaseaktivität mit einer verringerten CDK2 abhängigen Phosphorylierung des p27 Proteins.

T187 phosphoryliertes p27 wird durch den Ubiquitinligase-Komplex SCF<sup>SKP2</sup> erkannt und ubiquitinyliert. Daher wurde immunpräzipitiertes p27 auf den Phosphorylierungsstatus von T187 untersucht und mit dem Ubiquitinylierungsstatus korreliert. In den Western Blot Analysen traten mehrere Banden des ubiquitinkonjugierten p27 Proteins auf (Abb.20B), da immer mehrere Ubiquitinreste kovalent an die abzubauenen p27 Proteine angehängt werden (Kotoshiba et al., 2005). In nicht-transformierten (+Dox) Zellen wurden weniger Ubiquitin Banden als in den transformierten Zellen (-Dox) detektiert. Die Aktivierung von IRF-1 (+E2) verringert die Anzahl und die Intensität der Ubiquitin Banden (Abb.20B/C). Somit ist die IRF-1 vermittelte Akkumulation des p27 Proteins auf einen verringerten proteosomalen Abbau von p27 zurückzuführen.

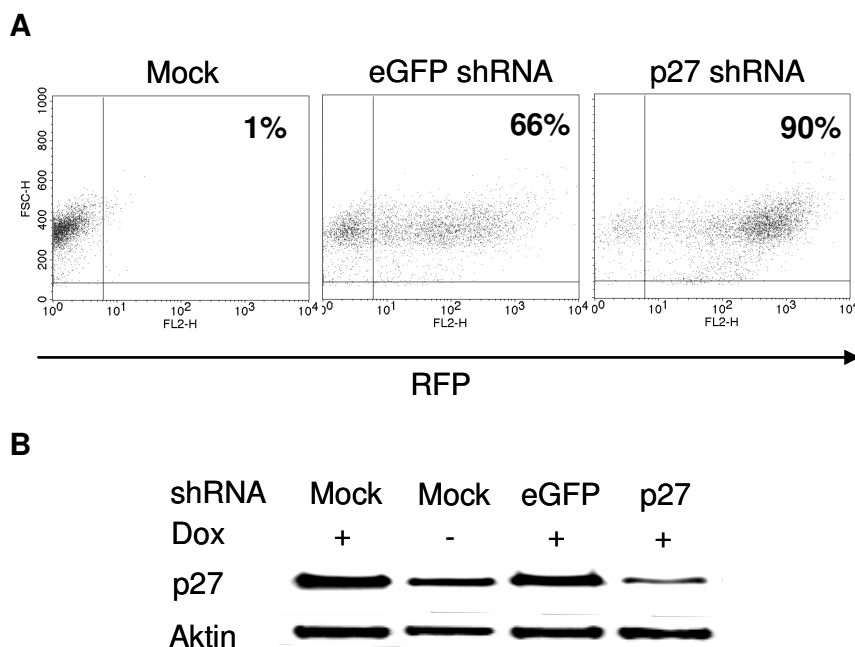


**Abb.20 Die Reduktion von T187 phosphoryliertem p27 korreliert mit der Abnahme der Ubiquitinylierung nach IRF-1 Aktivierung**

Myc/rasNIH3T3IH Zellen wurden im transformierten (-Dox) und nicht-transformierten (+Dox) Zustand untersucht. In den transformierten Zellen erfolgte die Aktivierung von IRF-1 (+E2) zu den angegebenen Zeitpunkten. (A) Die Zelllysate wurden in Western Blot Analysen auf ihre Konzentration an T187 phosphoryliertem p27 (p27-P) und Aktin untersucht. (B) Immunpräzipitate von p27 wurden mittels Western Blot Analysen auf ihre Ubiquitin (Ubq) und p27 Proteinkonzentrationen untersucht. (C) Die Intensitäten der Proteinbanden wurden mit dem Programm ImageQuant densitometrisch bestimmt. Die Intensität der Ubiquitin Bande wurde gegen die Intensität der p27 Bande abgeglichen und graphisch dargestellt. Das Verhältnis von p27 zu Ubiquitin der transformierten Zellen in denen IRF-1 inaktiv ist wurde als 100% definiert.

### 2.2.9. Einfluss von p27 auf die IRF-1 vermittelte Proliferationsinhibition

Die Aktivierung von IRF-1 verringert den proteolytischen Abbau von p27, wodurch es zur Akkumulation des Proteins kommt (Abb.19/20). Da erhöhte p27 Konzentrationen zum Zellzyklusarrest führen (Aprelikova et al., 1995; Kato et al., 1994) sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Akkumulation von p27 auf die IRF-1 vermittelte Proliferationsinhibition hat. Dazu wurden myc/rasNIH3T3IH Zellen, deren p27 Proteinkonzentration durch die Expression von short-hairpin (sh) RNAs reduziert war, eingesetzt. Die Zellen wurden mit Lentiviren, welche gegen p27 oder eGFP Zielsequenzen gerichtete shRNAs exprimierten, infiziert. Da die infizierten Zellen neben den shRNAs auch RFP exprimieren war es möglich, die Infektionseffizienz durch FACS Analysen zu bestimmen. Die Infektionsrate des Virus mit der p27-shRNA lag bei 90% und die des Virus mit der eGFP-shRNA bei 66% (Abb.21A). Die Effizienz der shRNAs wurde in Western Blot Analysen untersucht (Abb.21B). Die shRNA gegen eGFP hatten keinen Einfluss auf die p27 Proteinkonzentration. Im Gegensatz dazu wurde die Konzentration an p27 Protein durch die p27-shRNA um 70% gesenkt. In infizierten, p27 shRNA exprimierenden Zellen war die p27 Proteinkonzentration geringer als in nicht-transformierten Kontrollzellen (Abb.21B). Aus diesem Grund sollte die shRNA vermittelte Reduktion der p27 Konzentration ausreichen, um den Einfluss von p27 auf die IRF-1 Effekte zu untersuchen.



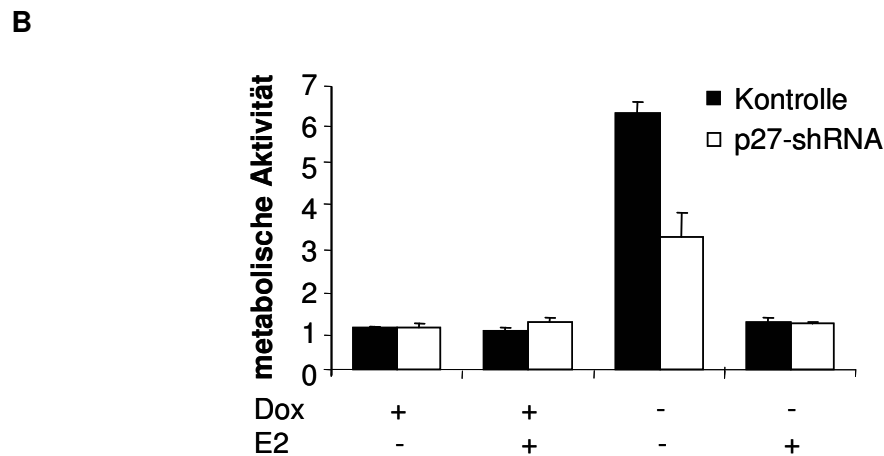
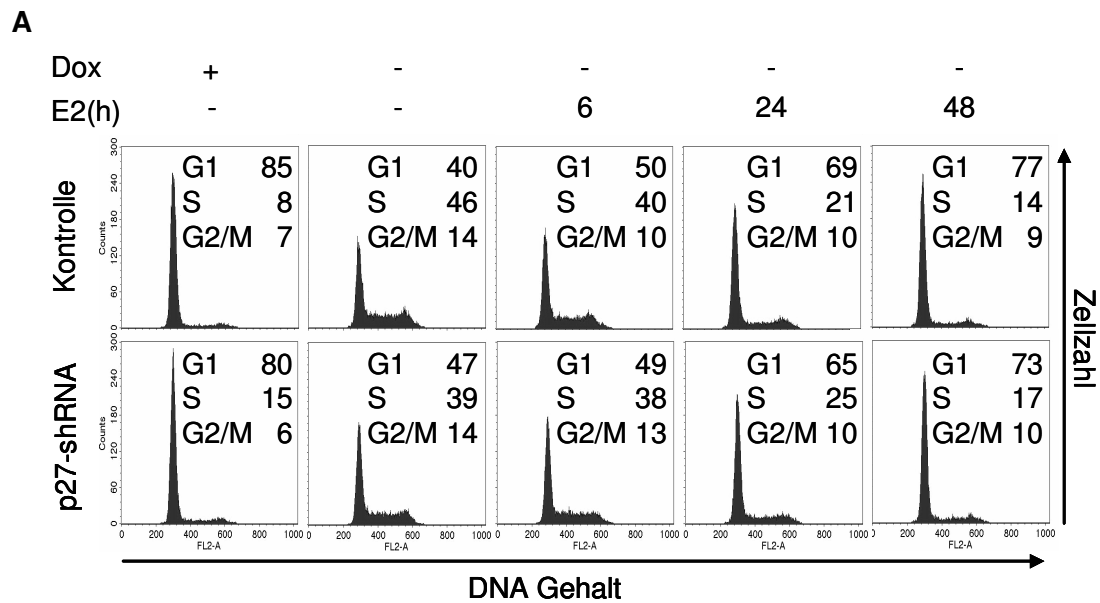
**Abb.21 Die shRNA gegen p27 senkt die p27 Proteinkonzentration**

Nicht-transformierte (+Dox) myc/rasNIH3T3IH Zellen wurden mit Lentiviren, die neben RFP auch shRNA gegen eGFP oder gegen p27 exprimierten, infiziert. Als Kontrolle dienten nicht infizierte Zellen mit transformiertem (-Dox) und nicht-transformiertem (+Dox) Phänotyp. **(A)** Die Infektionseffizienz wurde über die RFP Expression der integrierten Lentiviren im FACS bestimmt. Die Zahlen geben den Prozentsatz an RFP positiven Zellen an. **(B)** Zelllysate wurden in Western Blot Analysen auf ihre p27 und Aktin Proteinkonzentrationen untersucht.

### **2.2.9.1. p27 ist nicht an den antiproliferativen Effekten von IRF-1 beteiligt**

Bevor die Zelle mit der Zellteilung beginnen kann, muss sie den G1 Kontrollpunkt passieren. Antiproliferative Signale führen zur Stabilisierung von p27 und damit zur Inhibition der ZyklinE/CDK2 Komplexe. Auf diese Weise wird der Eintritt in die S Phase verhindert (Bartek and Lukas, 2001). Da die Aktivierung von IRF-1 zu einer Akkumulation des p27 Proteins führt (Abb.16), wurden myc/rasNIH3T3IH Zellen, deren p27 Proteinkonzentration mittels shRNAs gesenkt war, auf ihre Zellzyklusphasenverteilung untersucht (Abb.22A). 40% der transformierten, mit Kontrollviren infizierten Zellen (-Dox) befinden sich in der G1 Phase. Die Aktivierung von IRF-1 (+E2) bewirkt eine zeitabhängige Akkumulation von Zellen in der G1 Phase. Die Zellzyklusverteilung ist nach 48h IRF-1 Aktivität vergleichbar mit der in nicht-transformierten Zellen (+Dox). Bei transformierten Zellen, die mit der p27-shRNA infiziert sind, befanden sich 50% der Zellen in der G1 Phase. Die Aktivierung von IRF-1 führte auch hier zur Akkumulation von Zellen in der G1 Phase. Diese Daten zeigen, dass p27 für die Zellzyklus-regulatorischen Effekte von IRF-1 nicht essentiell ist.

Auch der Einfluss von p27 auf die IRF-1 vermittelte Inhibition der metabolischen Aktivität wurde in den p27shRNA exprimierenden Zellen untersucht (Abb.22B). Da die metabolische Aktivität von Zellen meistens mit ihrer Proliferation korreliert, sollte die Reduktion der p27 Proteinkonzentration keinen Einfluss auf die IRF-1 vermittelte Reduktion der metabolischen Aktivität haben. Transformierte Zellen (-Dox) weisen eine 4fach höhere metabolische Aktivität auf, als die Zellen im nicht-transformierten Zustand (+Dox). Die Aktivierung von IRF-1 (+E2) in den transformierten Zellen reduziert die metabolische Aktivität auf das Niveau von nicht-transformierten Zellen. Die beobachteten Veränderungen treten unabhängig davon auf, ob p27 in den Zellen reduziert ist oder nicht. Verglichen mit Zellen die keine shRNA exprimieren, zeigten die Zellen mit reduzierten p27-Gehalten eine geringere metabolische Aktivität (Abb.22B). Bei der Reduktion eines Zellzyklusinhibitors wurde eher der umgekehrte Effekt, eine Steigerung der metabolischen Aktivität, erwartet. Da das p27 Protein auch bei der Zellwanderung eine wichtige Rolle spielt (McAllister et al., 2003) wäre es möglich, dass Zellen mit geringen p27 Proteinkonzentrationen schlechter auf der Kulturschale anwachsen als Zellen mit hohen p27 Konzentrationen. In diesem Fall würde die p27 Reduktion weniger die metabolische Aktivität pro Zelle, sondern vielmehr die Anzahl der proliferierenden Zellen verändern. Die Ergebnisse zeigen, dass die Akkumulation von p27 keinen Einfluss auf die antiproliferativen Effekte von IRF-1 hat.

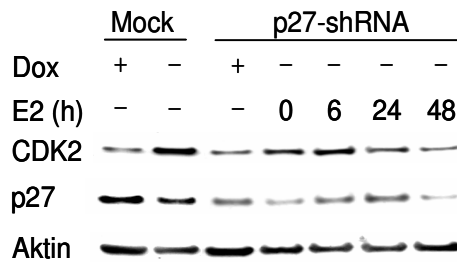


**Abb.22 p27 ist nicht essentiell für die antiproliferativen IRF-1 Effekte**

Myc/rasNIH3T3IH Zellen wurden mit Lentiviren, die eine p27 shRNA exprimieren, infiziert. Für die Kontrolle wurden Zellen mit einem Lentivirus, dessen Expressionskassette keine shRNA enthält, infiziert. IRF-1 wurde in transformierten (-Dox) und nicht-transformierten (+Dox) Zellen durch die Zugabe von Östradiol aktiviert (+E2). (A) Für die Zellzyklusanalyse wurden die Zellen fixiert, ihre DNA mit PI angefärbt und im FACS analysiert. (B) Die Proliferation wurde durch Messung der metabolischen Aktivität im WST Test bestimmt. Die metabolische Aktivität von nicht-transformierten Zellen (+Dox) wurde als 1 definiert.

### 2.2.9.2. Einfluss von p27 auf die IRF-1 vermittelte CDK2 Reduktion

Die Aktivierung von IRF-1 führt in myc/ras-transformierten Zellen zur Reduktion der CDK2 Proteinkonzentration (Abb.14) und zur Akkumulation von p27 (Abb.16). IRF-1 bewirkt die Abnahme des CDK2 Proteins durch eine Reduktion der CDK2 Expression (Xie et al., 2003). Da beide IRF-1 vermittelten Effekte zum selben Zeitpunkt auftreten ist es unwahrscheinlich, dass die Akkumulation von p27 zur Reduktion der CDK2 Proteinkonzentration beiträgt. Um dies auszuschließen, wurde die CDK2 Proteinkonzentration in Zellen analysiert, deren p27



**Abb.23 p27 hat keinen Einfluss auf die CDK2 Reduktion durch IRF-1**

Die p27 Proteinkonzentration wurde in transformierten (-Dox) und nicht-transformierten (+Dox) myc/ rasNIH3T3IH Zellen mit Hilfe eines Lentivirus, das eine shRNA gegen p27 kodiert (p27-shRNA), reduziert. Nicht infizierte Zellen (Mock) dienten als Kontrolle. IRF-1 wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten aktiviert (+E2). Die Zelllysate wurden in Western Blot Analysen auf ihre CDK2, p27 und Aktin Proteinkonzentrationen untersucht.

Proteinspiegel durch die Expression von shRNAs verringert war (Abb.23). In diesen Zellen ist die CDK2 Konzentration im nicht-transformierten Zustand (+Dox) geringer, als im transformierten Zustand (-Dox). Im transformierten Zustand bewirkt die Aktivierung von IRF-1 (+E2) eine Reduktion der CDK2 Proteinkonzentration. Dieselben Effekte sieht man in myc/rasNIH3T3IH Zellen, deren p27 Proteinkonzentration nicht verändert wurde (Abb.23). Damit kann die IRF-1 vermittelte Akkumulation der p27 Proteine als Ursache für die Reduktion der CDK2 Proteinkonzentration ausgeschlossen werden.

### 2.3. Charakterisierung der antiviralen IRF-1 Effekte

IRF-1 induziert eine Reihe von Genen, deren Genprodukte antivirale Aktivität besitzen. Die bekanntesten sind 2'-5'-OAS, PKR, GBP und iNOS (Briken et al., 1995; Kamijo et al., 1994; Kirchhoff et al., 1995; Olszewski et al., 2006; Ramsauer et al., 2007). Bis auf iNOS können all diese Gene IRF-1 unabhängig über den Typ I Interferon (IFN) Signalweg induziert werden (Kimura et al., 1994). Vergleichende Replikationsexperimente mit embryonalen Fibroblasten der Maus (MEFs) die nur ein funktionales IRF-1 Gen (IRF-1<sup>+/-</sup> ARLT) oder gar kein funktionelles IRF-1 Gen (IRF-1<sup>-/-</sup> ARLT) besitzen belegen, dass IRF-1 Typ I IFN vermittelte antivirale Effekte induziert (Tabelle 5). Die MEFs wurden für 24h mit IFN-β vorstimuliert und anschließend für 1h mit dem Vesicular Stomatitis Virus (VSV) infiziert. 24h nach der Infektion wurde die Anzahl an neu produzierten Viren mit Hilfe eines Titertests bestimmt. Dazu wurde die Lyse von LMTK<sup>-</sup> Zellen, die in den Überständen der infizierten MEFs kultiviert wurden, analysiert. Bei den IRF-1<sup>-/-</sup> ARLT MEFs war die Anzahl an neu produzierten Viren 100fach höher, als bei den IRF-1<sup>+/-</sup> ARLT MEFs (Tabelle 5). Somit ist IRF-1 an der Ausbildung des IFN vermittelten, antiviralen Effekts beteiligt.

Um zu untersuchen, ob IRF-1 auch IFN unabhängige antivirale Mechanismen induziert, wurde die VSV Replikation in MEFs, die nicht mit IFN vorbehandelt waren, analysiert. Bei den IRF-1<sup>-/-</sup> ARLT MEFs war der Virustiter  $1 \times 10^7$  Mal so hoch wie bei IRF-1<sup>+/-</sup> ARLT MEFs

(Tabelle 5). Der Replikationstest zeigt, dass IRF-1 nicht nur IFN vermittelte sondern auch IFN unabhängige, antivirale Effekte induzieren kann.

**Tabelle 5: IRF-1 vermittelt IFN abhängige und IFN unabhängige antivirale Aktivität**

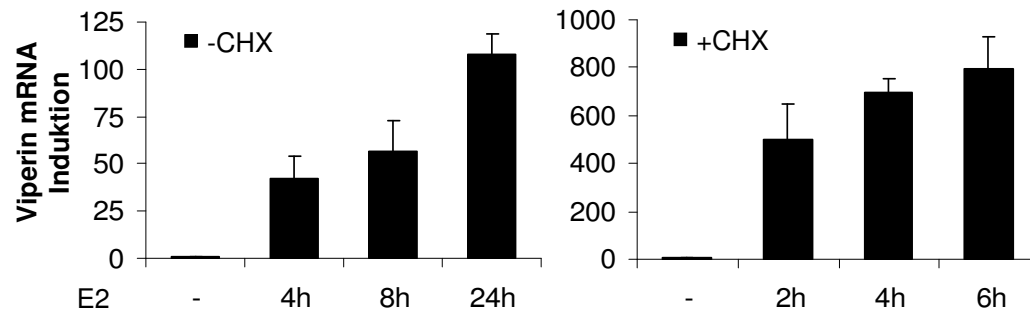
	infektiöse VSV Partikel pro ml (24h p.i.)	
	+ IFN- $\beta$ (500U/ml)	- IFN- $\beta$
IRF-1 <sup>+/-</sup> ARLT	1x10 <sup>1</sup>	1x10 <sup>10</sup>
IRF-1 <sup>-/-</sup> ARLT	1x10 <sup>3</sup>	1x10 <sup>17</sup>

[p.i. = post infection; nach der Infektion]

### 2.3.1. IRF-1 induziert die Expression von Viperin

Aus den oben beschriebenen Untersuchungen geht hervor, dass IRF-1 IFN vermittelte, aber auch IFN unabhängige antivirale Effekte induziert. Bisher sind noch nicht alle Gene, deren Genprodukte an den antiviralen Effekten von IRF-1 beteiligt sind, identifiziert. Mittels Genexpressionsanalysen wurden 66 direkte IRF-1 Zielgene identifiziert, deren transkriptionelle Regulation durch IRF-1 zuvor noch nicht beschrieben war (Kapitel 2.1.4.). Unter ihnen das Viperin, ein evolutionär hoch konserviertes Interferon stimuliertes Gen (ISG) mit antiviraler Aktivität, dessen Homologe bereits bei Fischen vorkommen (Boudinot et al., 1999; Boudinot et al., 2000; Grewal et al., 2000; Sun and Nie, 2004). Zunächst sollte bestätigt werden, dass es sich bei Viperin tatsächlich um ein direktes IRF-1 Zielgen handelt. Mit Hilfe von qRT-PCR Analysen wurde der Einfluss von IRF-1 auf die Expression von Viperin untersucht. In myc/rasNIH3T3IH Zellen führte die Aktivierung von IRF-1 (+E2) bereits nach 4h zu einem 42fachen Anstieg der Viperin mRNA Menge (Abb.24A). Die stärkste Viperin Induktion wurde 24h nach der IRF-1 Aktivierung gemessen. Um zu untersuchen, ob die Viperin Induktion direkt durch IRF-1 oder durch IRF-1 induzierte Zielgene erfolgt, wurde die Translation der Zellen durch CHX gehemmt (Abb.24B). Die Aktivierung des konstitutiv exprimierten IRF-1hER Fusionsproteins führte zur Superinduktion der Viperin mRNA Konzentration. Eine solche CHX vermittelte Superinduktion wurde bereits für verschiedene Gene gezeigt (Dinter and Hauser, 1987; Efrat and Kaempfer, 1984; Ernest et al., 1978; Kelly et al., 1983). Es wird vermutet, dass die Proteinkonzentration von Inhibitoren der Transkription oder Proteinen welche die mRNA Halbwertszeit verkürzen durch die Translationsinhibition sehr stark reduziert werden (Tomkins et al., 1966). Die Voraussetzung für einen solchen Mechanismus ist eine sehr kurze Halbwertszeit inhibitorischer Proteine. Da die IRF-1

vermittelte Induktion der Viperin Expression ohne de novo Synthese von Proteinen erfolgt, muss es sich bei Viperin um ein direktes IRF-1 Zielgen handeln.



**Abb.24 IRF-1 induziert die Expression von Viperin**

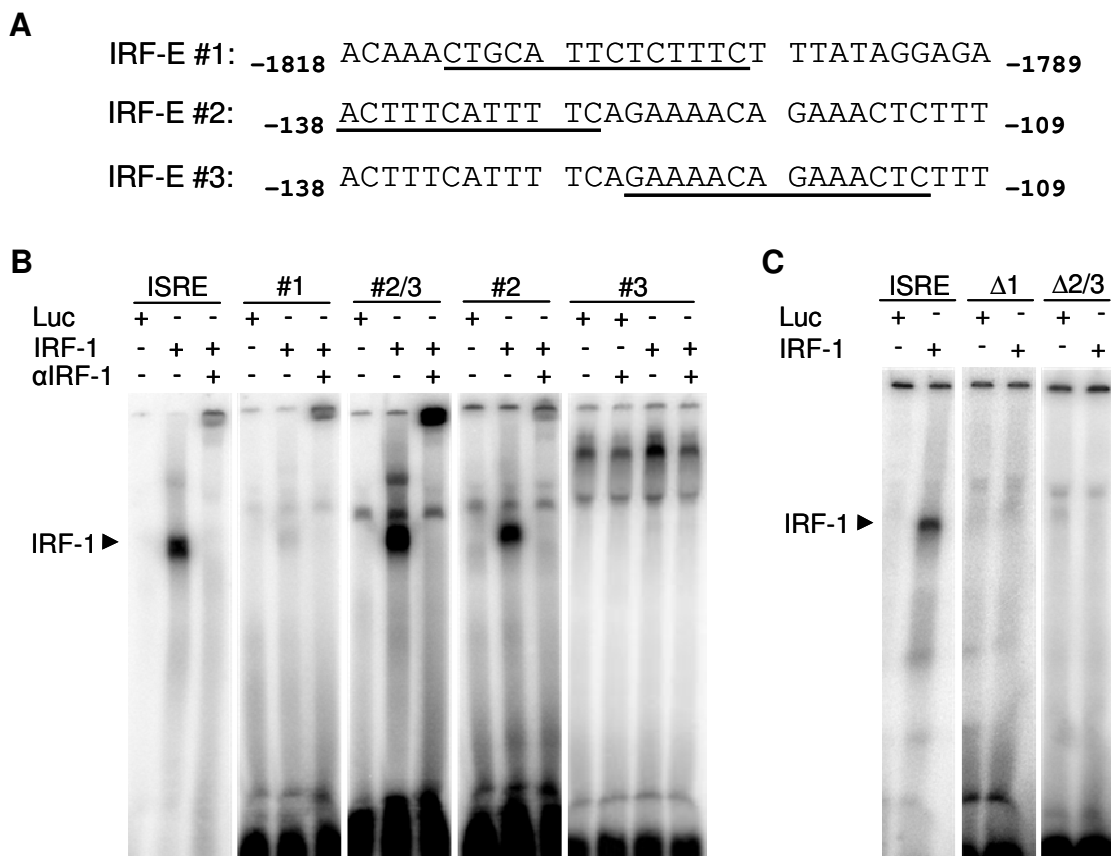
Myc/rasNIH3T3IH Zellen wurden mittels qRT-PCR auf IRF-1 vermittelte Änderungen der Viperin mRNA Konzentration untersucht. Die mRNA Konzentration der Proben wurde über ihre Aktin mRNA Konzentrationen abgeglichen. Die Viperin mRNA Konzentration in transformierten Zellen in denen IRF-1 inaktiv war (-E2) wurde als 1 definiert. IRF-1 wurde für die angegebenen Zeitspannen durch Zugabe von Östradiol aktiviert (+E2). Die Inhibition der Translation erfolgte 2h vor der IRF-1 Aktivierung, durch Zugabe von 50µg/ml Cycloheximid (+CHX) zum Kulturmedium.

### 2.3.1.1. IRF-1 interagiert mit den IRF-Es des Viperin Promotors

IRF-1 aktiviert die Transkription seiner Zielgene, indem es an die IRF-E genannte Konsensussequenz  $G(A)AAA^{G/T}/C^{G/T}/C$  bindet (Tanaka et al., 1993). Bei der Analyse des murinen Viperin Promotors wurden drei potentielle IRF-Es, die mindesten 70% Homologie zur Konsensussequenz aufweisen, identifiziert (Tabelle 3). Das erste IRF-E (IRF-E#1) liegt 1813 Nukleotide entfernt vom Transkriptionsstart (Abb.25A), während die beiden anderen IRF-Es (IRF-E#2, #3) in unmittelbarer Nähe des Transkriptionsstarts liegen. Um zu klären, ob IRF-1 diese potentiellen IRF-Es bindet, wurden „Electromobility Shift Assays“ (EMSAs) durchgeführt. Die Komplexbildung mit Protein bewirkt eine verminderte elektrophoretische Mobilität der radioaktiv markierten Oligonukleotide in nicht-denaturierenden Polyacrylamidgelen. Durch die Zugabe spezifischer Antikörper wird die Mobilität der DNA/Protein Komplexe verringert (Super-Shift) oder die Komplexbildung zwischen DNA und Protein verhindert (Block). Für den EMSA wurden Oligonukleotide eingesetzt, welche die IRF-Es mit ihren umliegenden Sequenzen repräsentieren. Die Oligonukleotide wurden radioaktiv markiert und mit in vitro translatiertem IRF-1 inkubiert. Zwischen den Oligonukleotiden #1, #2, #2/3 und IRF-1 kommt es zur Ausbildung eines DNA/Protein Komplexes (Abb.25B). Die Spezifität der Komplexbildung konnte für alle drei Oligonukleotide, durch Zugabe eines gegen IRF-1 gerichteten Antikörpers ( $\alpha$ -IRF-1) und dem daraus resultierenden „Super-Shift“, gezeigt werden. Das Oligonukleotid #3 interagiert sowohl



mit IRF-1 als auch mit der Negativkontrolle (Luc). Die Zugabe eines gegen IRF-1 gerichteten Antikörpers verringert die Signalintensität der #3/IRF-1 Komplexe, jedoch nicht die Intensität der #3/Luc Komplexe. Damit ist gezeigt, dass alle Oligonukleotid spezifische Komplexe mit IRF-1 ausbilden. Im Gegensatz dazu bilden Oligonukleotide mit Mutationen im IRF-E keine Komplexe mit IRF-1 aus (Abb.25C). Die EMSAs zeigen, dass IRF-1 in der Lage ist mit den drei potentiellen IRF-Es zu interagieren. Dabei ist die Sequenz der IRF-Es entscheidend für die Bildung spezifischer Komplexe.

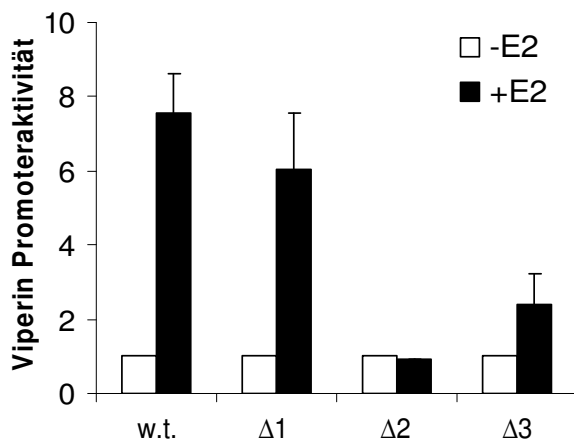


**Abb.25 IRF-1 bindet an IRF-E Sequenzen aus dem Viperin Promotor**

- 10 Schematische Abbildung der potentiellen IRF-Es und ihren umgebenen Sequenzen im Viperin Promotor. Die IRF-E Konsensussequenz ist unterstrichen, Zahlen geben die relative Position zum Transkriptionsstart an. (B) Die Bildung von IRF-1 / DNA Komplexen wurde im EMSA untersucht. Für den EMSA wurden Oligonukleotide eingesetzt, welche die IRF-Es mit ihren umliegenden Sequenzen repräsentieren (#1, #2/3, #2, #3). Ein modifiziertes ISRE Oligonukleotid (ISRE), abgeleitet vom IFN- $\beta$  Promotor (Kirchhoff et al., 1993), diente als Positivkontrolle. Die Oligonukleotide wurden radioaktiv markiert und mit in vitro translatiertem IRF-1 inkubiert (IRF-1). In vitro translatierte Luziferase (Luc) diente als Kontrolle für unspezifische Komplexbildung. Super-Shifts wurden mit einem gegen IRF-1 gerichteten Antikörper ( $\alpha$ IRF-1) durchgeführt. (C) Der EMSA wurde wie für (B) beschrieben durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotide hatten jedoch Mutationen im IRF-E#1 ( $\Delta$ 1) oder in den IRF-Es #2 und #3 ( $\Delta$ 2/3).

### 2.3.1.2. Funktionalität der IRF-Es im Viperin Promotor

Die Ausbildung spezifischer Komplexe zwischen IRF-1 und den drei potentiellen IRF-Es des Viperin Promotors konnte bereits nachgewiesen werden (Abb.25). Deshalb sollte untersucht werden, ob die Interaktion zwischen IRF-1 und den IRF-Es einen Einfluss auf die Aktivität des Viperin Promotors hat. Für Reportergeranalysen wurden myc/rasNIH3T3IH Zellen mit einem Vektor, in dem die Luciferase Expression durch den w.t. Viperin Promotor kontrolliert wird, transient transfiziert (Abb.26). Des Weiteren wurden Reporterkonstrukte verwendet, bei denen die einzelnen IRF-Es im Viperin Promotor mutiert sind ( $\Delta$ #1,  $\Delta$ #2,  $\Delta$ #3). Die Aktivierung von IRF-1 (+E2) führt zu einer 8fachen Induktion des Viperin Reporters. Die Mutation des IRF-E #1 ( $\Delta$ #1) beeinträchtigt die Promotoraktivität nach IRF-1 Aktivierung nur geringfügig. Dies korreliert mit der sehr schwachen Bindung von IRF-1 und Oligonukleotid #1 im EMSA (Abb.25B). Die Mutation des IRF-E #3 ( $\Delta$ #3) reduziert die Promotoraktivität um das 3fache (Abb.26). Im Gegensatz dazu, führt die Mutation des IRF-E #2 ( $\Delta$ #2) zum kompletten Verlust der Promotoraktivität. Zwar scheint das distale IRF-E nur eine geringe Rolle bei der IRF-1 vermittelten Aktivierung des Viperin Promotors zu spielen, die proximalen IRF-Es #2 und #3 sind jedoch essentiell.



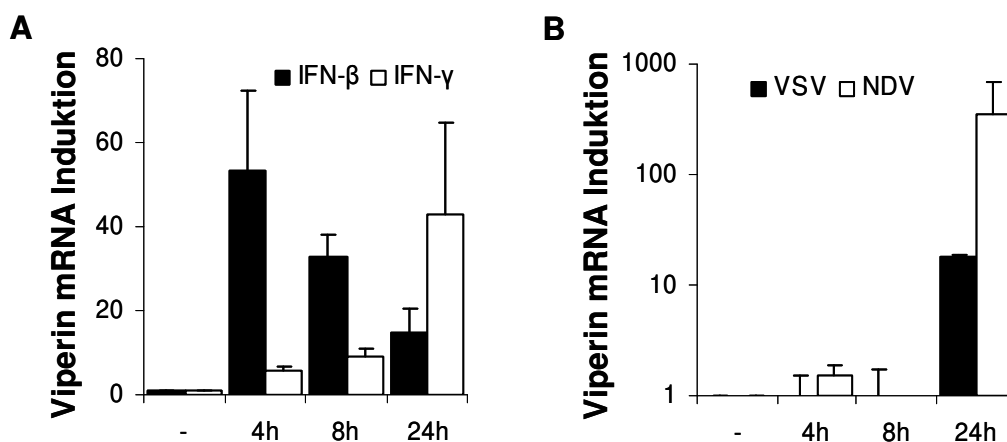
**Abb.26 Die Bindung von IRF-1 induziert die Aktivität des Viperin Promotors**

Myc/rasNIH3T3IH Zellen wurden mit einem Viperin-Promotor/Luziferase Konstrukt transient transfiziert. Die Viperin Promotorsequenz war entweder unverändert (w.t.) oder mit Mutationen in einem der IRF-Es ( $\Delta$ 1,  $\Delta$ 2 oder  $\Delta$ 3). IRF-1 wurde für 24h aktiviert (+E2). Die Luziferase Aktivität von Zellen in denen IRF-1 inaktiv war (-E2) wurde als 1 definiert. Die Aktivität des Viperin Promotors entspricht der Induktion der Luciferase Aktivität. Die Kotretransfektion eines Renilla Luziferase Vektors ermöglichte den Abgleich der Transfektionseffizienzen. Für drei unabhängige Experimente wurden jeweils Triplikate angefertigt.

### 2.3.2. Viperin wird durch Interferone und Viren induziert

Viperin ist ein direktes IRF-1 Zielgen mit antiviraler Aktivität. IRF-1 kann seine antiviralen Effekte sowohl IFN abhängig als auch IFN unabhängig vermitteln (Tabelle 5). Es wurde nun untersucht, ob die Viperin Expression durch IFN Behandlung und Virusinfektionen induziert wird. Der Einfluss von IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$  und den (ss)RNA Viren VSV und NDV auf die Viperin Expression wurde in NIH3T3 Zellen analysiert. Die Bestimmung der Viperin mRNA Konzentration erfolgte zeitabhängig mittels qRT-PCR. Zellen die mit IFN- $\beta$  behandelt wurden,

erreichten das Maximum an Viperin mRNA bereits nach 4h (Abb.27A). Diese frühe Induktion von Viperin durch IFN- $\beta$  lässt auf einen direkten Induktionsmechanismus schließen. Die Behandlung mit IFN- $\gamma$  führte zwar nach 4h zu einem geringen Anstieg der Viperin mRNA Konzentration, die stärkste Induktion der Viperin Expression erfolgte aber erst nach 24h (Abb. 27A). Die Kinetiken der Viperin mRNA Induktion nach VSV und NDV Infektion waren vergleichbar mit der Kinetik nach IFN- $\gamma$  Gabe. Beide Viren bewirkten erst nach 24h eine signifikante Induktion der Viperin Expression (Abb.27B). Wahrscheinlich vermitteln IFN- $\gamma$ , VSV und NDV die Induktion der Viperin Expression im Gegensatz zu IFN- $\beta$  über einen indirekten Mechanismus.



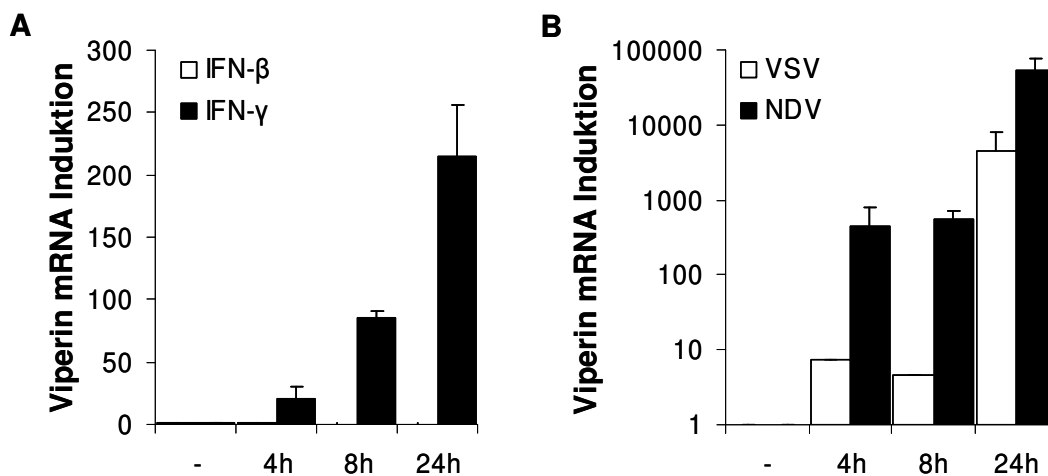
**Abb.27 Induktion der Viperin Expression nach IFN Stimulation und Virus Infektion**

NIH3T3 Zellen wurden, mittels qRT-PCR, auf Veränderungen der Viperin mRNA Konzentrationen untersucht. Die mRNA Konzentrationen der Proben wurden über ihre Aktin mRNA Konzentrationen untereinander abgeglichen. Die Viperin mRNA Konzentration in Zellen ohne IFN bzw. Virus wurden als 1 definiert. (A) Die Zellen wurden für die angegebene Zeitspanne mit 500U/ml IFN- $\beta$  oder IFN- $\gamma$  stimuliert. (B) Die Zellen wurden für 1h mit VSV bzw. NDV infiziert. Angegeben ist der Zeitpunkt nach der Infektion, an dem die Zellen aufgearbeitet wurden.

### 2.3.3. VSV und NDV induzieren Viperin Typ I IFN unabhängig

Einer der wichtigsten Mechanismen bei der Abwehr von Virusinfektionen ist die Produktion und Sekretion von Typ I IFN. Es wurde bereits gezeigt, dass IFN- $\beta$  die Expression von Viperin induziert. Um zu untersuchen, ob VSV und NDV die Transkription des Viperingens Typ I IFN abhängig induzieren, wurden MEFs, die einen Defekt im Typ I IFN Rezeptor (IFNAR<sup>-/-</sup>) aufweisen, verwendet. Auf Grund des fehlenden Rezeptors sind die Typ I IFNs nicht mehr in der Lage die Aktivierung des Typ I IFN Signalweges und die daraus resultierende Induktion der ISGs zu vermitteln. Der Einfluss von IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , VSV und NDV auf die Viperin mRNA Konzentration wurde mittels qRT-PCR in IFNAR<sup>-/-</sup> MEFs untersucht. Nach der Behandlung mit IFN- $\beta$  war die Konzentration der Viperin mRNA ähnlich hoch wie in unbehandelten

IFNAR<sup>-/-</sup> MEFs (Abb.28A). Im Gegensatz dazu war 24h nach der IFN- $\gamma$  Stimulation eine 200fache Induktion der Viperin mRNA zu beobachten. Die Infektion der IFNAR<sup>-/-</sup> MEFs mit VSV und NDV führte ebenfalls zur Induktion der Viperin mRNA Konzentration (Abb.28B). Die Kinetiken der Viperin mRNA Induktion nach IFN- $\gamma$  Stimulation und nach VSV und NDV Infektion sind im Vergleich zu w.t. Zellen unverändert (Abb.27/28). Somit hat das Fehlen des Typ I IFN Rezeptors keinen Einfluss auf die Induktion der Viperin Expression nach VSV und NDV Infektion. Daher muss es einen Typ I IFN unabhängigen Weg geben, über den die Viren die Viperin Expression induzieren.



**Abb.28 Die Virus induzierte Viperin Expression ist Typ I IFN unabhängig**

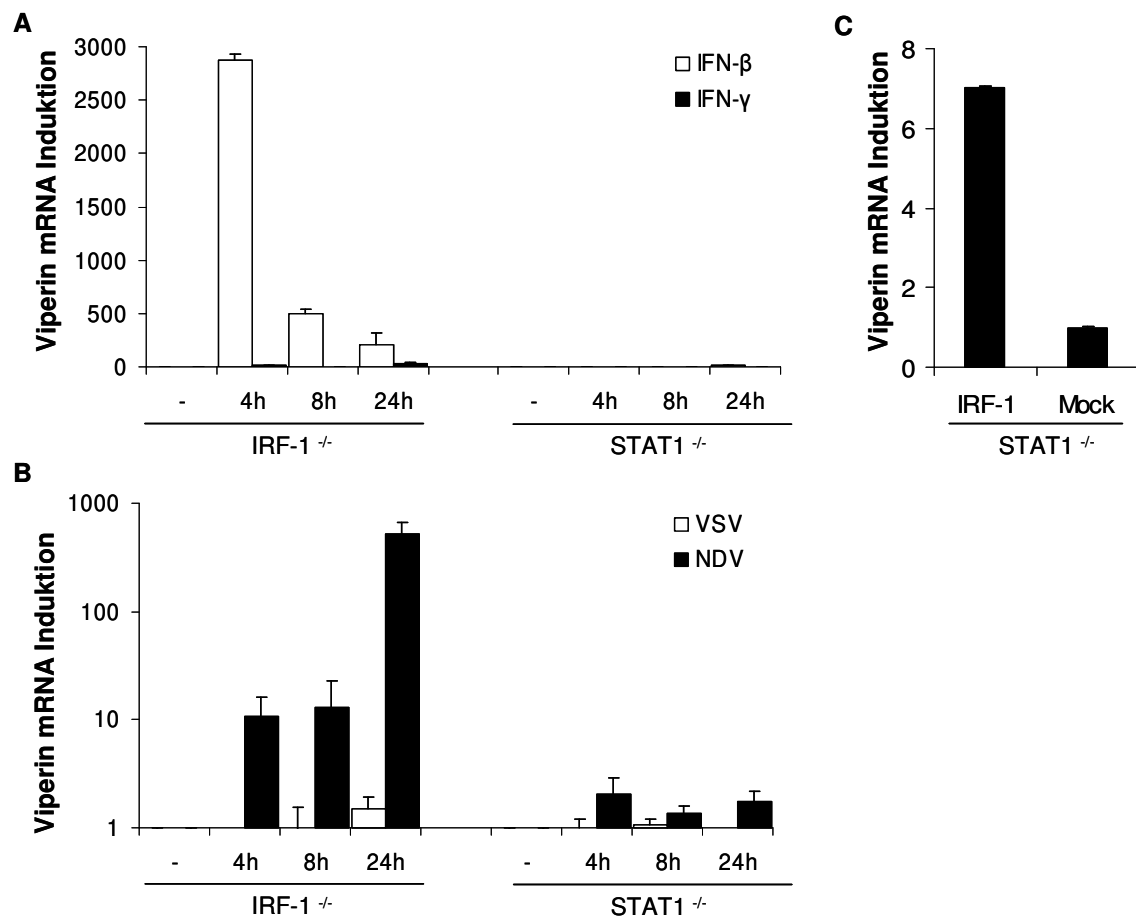
MEFs mit einem Defekt im Typ I IFN Rezeptor (IFNAR<sup>-/-</sup>) wurden, mittels qRT-PCR, auf Veränderungen der Viperin mRNA Konzentrationen untersucht. Der Abgleich der Proben erfolgte über ihre Aktin mRNA Konzentrationen, dabei wurden die mRNA Konzentrationen in Zellen ohne IFN bzw. Virus als 1 definiert. **(A)** Die Zellen wurden für die angegebene Zeitspanne mit 500 U/ml IFN- $\beta$  oder IFN- $\gamma$  stimuliert. **(B)** Die Zellen wurden für 1h mit VSV bzw. NDV infiziert. Angegeben ist der Zeitpunkt nach der Infektion, an dem die Zellen aufgearbeitet wurden.

#### 2.3.4. Die Induktion der Viperin Expression nach VSV Infektion ist IRF-1 abhängig

VSV und NDV können die Viperin Expression über einen Typ I IFN unabhängigen Mechanismus induzieren (Abb.28B). Der Einfluss von STAT1 und IRF-1 auf diesen Typ I IFN unabhängigen Mechanismus wurde in MEFs, welche kein funktionelles IRF-1 (IRF-1<sup>-/-</sup>) oder kein funktionelles STAT1 (STAT1<sup>-/-</sup>) besitzen, analysiert. Dazu wurden die Zellen mit IFN- $\beta$  bzw. IFN- $\gamma$  behandelt oder mit VSV bzw. NDV infiziert und auf Veränderungen der Viperin mRNA Konzentration untersucht.

Die Behandlung der IRF-1<sup>-/-</sup> MEFs mit IFN- $\beta$  führte bereits nach 4h zu einem 3000fachen Anstieg der Viperin mRNA Konzentration (Abb.29A). Im Gegensatz dazu führte die IFN- $\gamma$  Gabe nicht zur Induktion der Viperin Expression. Die Viperin Induktion nach NDV Infektion

ist in den IRF-1<sup>-/-</sup> MEFs im Vergleich zu w.t. Zellen unverändert (Abb. 27/29B). Die Infektion mit VSV führte jedoch in den IRF-1<sup>-/-</sup> MEFs nicht zur Induktion der Viperin Expression (Abb.29B). Diese Analysen zeigen, dass IRF-1 für die IFN- $\gamma$  und VSV vermittelte Viperin Induktion essentiell ist. In den STAT1<sup>-/-</sup> MEFs konnte die Viperin Expression weder durch IFN- $\beta$  bzw. IFN- $\gamma$  Gabe noch durch die Infektion mit VSV bzw. NDV induziert werden (Abb.29A/B). Somit ist STAT1 für die Induktion der Viperin Expression durch die vier hier untersuchten Stimuli essentiell.



**Abb.29 IRF-1 ist essentiell für die VSV und IFN- $\gamma$  induzierte Viperin Expression**

IRF-1<sup>-/-</sup> und STAT1<sup>-/-</sup> MEFs wurden, mittels qRT-PCR, auf Veränderungen der Viperin mRNA Konzentration untersucht. Die mRNA Konzentration der Proben wurde über ihre Aktin Konzentrationen untereinander abgeglichen. (A) Die Zellen wurden für die angegebene Zeitspanne mit 500 U/ml IFN- $\beta$  oder IFN- $\gamma$  stimuliert. (B) Die Zellen wurden für 1h mit VSV bzw. NDV infiziert. Angegeben ist der Zeitpunkt nach der Infektion, an dem die Zellen aufgearbeitet wurden. (C) STAT1<sup>-/-</sup> MEFs wurden mit einem IRF-1 Expressionsvektor (IRF-1) transient transfiziert. Als Kontrolle dienten Zellen, die ohne DNA transfiziert wurden (Mock). Die Zellen wurden 48h nach der Transfektion aufgearbeitet.

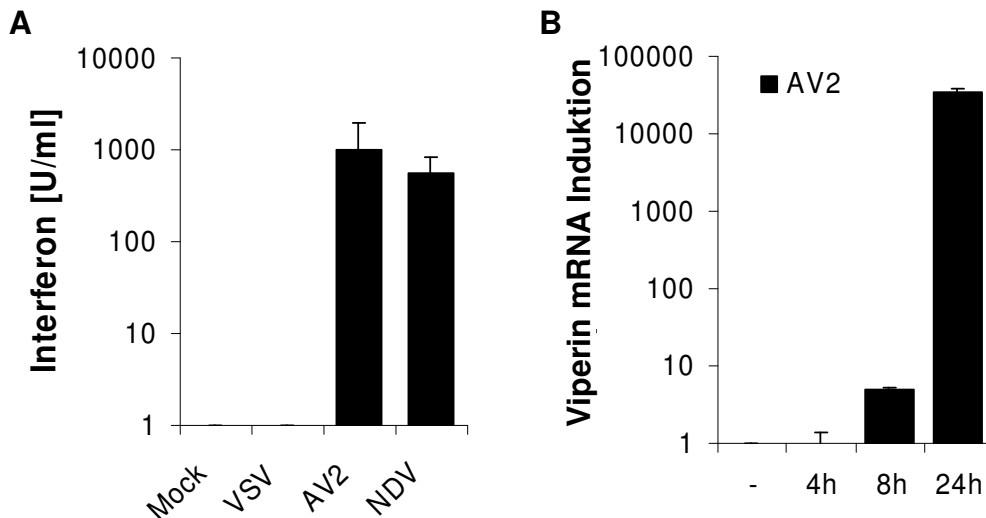
Bei IRF-1 und auch bei STAT1 handelt es sich um Transkriptionsfaktoren die ihre Zielgene durch die Interaktion mit Promotorelementen transkriptionell aktivieren. Da STAT1 zusammen mit NF- $\kappa$ B die IRF-1 Expression induziert, könnte die fehlende IRF-1 mRNA Induktion in den STAT1<sup>-/-</sup> MEFs der Grund für die fehlende VSV vermittelte Viperin mRNA Induktion sein. Es

wäre aber auch möglich, dass STAT1 zusammen mit IRF-1 die Viperin Expression induziert. Ein solches kooperatives Zusammenwirken von IRF-1 und nicht-phosphoryliertem (inaktivem) STAT1 wurde schon bei der transkriptionellen Induktion von LMP2/TAP1 gezeigt (Chatterjee-Kishore et al., 2000). Um die Induktion von IRF-1 nach Virusinfektion in den STAT1<sup>-/-</sup> MEFs zu simulieren, wurden die Zellen mit einem IRF-1 Expressionsvektor transient transfiziert. Anschließend wurde die Expression von Viperin mittels qRT-PCR analysiert. Die Überexpression von IRF-1 bewirkte in den STAT1<sup>-/-</sup> MEFs eine 7fache erhöhte Viperin mRNA Konzentration im Vergleich zu Mock behandelten Zellen (Abb.29C). Dieser Versuch zeigt, dass STAT1 benötigt wird, um die Transkription von IRF-1 zu induzieren, welches dann den Viperin Promotor aktiviert.

### **2.3.5. IRF-1 induziert die Viperin mRNA Typ I IFN unabhängig**

Viele Viren haben Mechanismen entwickelt um den IFN Signalweg zu inhibieren (Haller et al., 2006). Die Blockade der IFN Signalkaskade durch VSV könnte eine mögliche Erklärung auf die Frage sein, warum IRF-1 nur für die VSV induzierte Viperin Expression essentiell ist. Es sollte daher untersucht werden, ob die Infektion der Zellen mit VSV oder NDV zur Sekretion von IFN führt. Dazu wurden verschiedene Zelllinien mit VSV und NDV infiziert und die IFN Konzentration im Überstand bestimmt. Hier dargestellt sind die Ergebnisse aus IRF-1<sup>-/-</sup> MEFs (Abb. 2.3.5.A). Dieselben Ergebnisse zeigten sich aber auch bei den anderen untersuchten Zelllinien NIH3T3, IFNAR<sup>-/-</sup>, und STAT1<sup>-/-</sup> (Daten nicht gezeigt). Im Überstand von NDV infizierten IRF-1<sup>-/-</sup> MEFs konnten 700U IFN pro ml Überstand nachgewiesen werden (Abb.30A). Im Gegensatz dazu führte die Infektion mit VSV nicht zur Sekretion von IFN.

VSV Viren sind in der Lage die IFN Produktion mit Hilfe ihres M Proteins zu blockieren (Ahmed et al., 2003). Dies geschieht zum einen durch die Inhibition der IFN Transkription und zum anderen durch die Blockade des mRNA Transports ins Zytoplasma. Der VSV Stamm AV2 besitzt ein mutiertes M Protein, daher kann das Virus die IFN Expression und Sekretion nicht blockieren (Stojdl et al., 2003). IRF-1 ist für die VSV vermittelte jedoch nicht für die NDV vermittelte Viperin Induktion essentiell. Da VSV die IFN Produktion blockiert funktioniert in den IRF-1 defizienten MEFs wahrscheinlich weder der Typ I IFN abhängige, noch der IRF-1 abhängige Mechanismus der Viperin mRNA Induktion. Somit müsste die Infektion von IRF-1<sup>-/-</sup> MEFs mit einem IFN produzierenden VSV Virus zur Induktion der Viperin Expression führen.



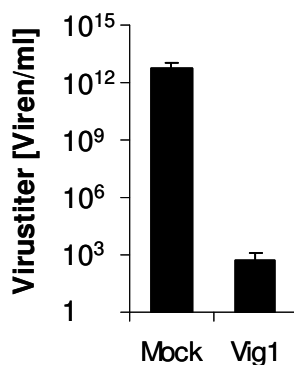
**Abb.30 Die IRF-1 vermittelte Viperin Induktion ist essentiell, wenn das IFN System blockiert ist**

IRF-1<sup>-/-</sup> MEFs wurden für 1h mit NDV, VSV oder dem VSV Stamm AV2 infiziert. (A) 24h nach der Infektion wurde die IFN Konzentration im Überstand bestimmt. (B) Veränderungen der Viperin mRNA Konzentration nach AV2 Infektion wurden mittels qRT-PCR analysiert. Auf der X-Achse angegeben, sind die Zeitpunkte nach der Infektion, an denen die Zellen aufgearbeitet wurden. Die mRNA Konzentrationen der Proben wurden über ihre Aktin mRNA Konzentrationen abgeglichen.

Zunächst wurde untersucht, ob die IRF-1<sup>-/-</sup> MEFs nach der Infektion mit dem AV2 Virus IFN sekretieren. Anschließend wurde die zeitabhängige Induktion der Viperin mRNA Konzentration nach der AV2 Infektion mittels qRT-PCR bestimmt. Im Überstand der infizierten IRF-1<sup>-/-</sup> MEFs wurden 1000U IFN pro ml detektiert (Abb.30A). 24h nach der AV2 Infektion kam es zu einem starken Anstieg der Viperin mRNA Konzentration (Abb.30B). Es scheint, dass IRF-1 immer dann für die Etablierung antiviraler Mechanismen essentiell ist, wenn das IFN System durch die Viren inhibiert wird.

### 2.3.6. Viperin inhibiert die VSV Replikation

Es wurde bereits gezeigt, dass die Überexpression von Viperin die HCMV Produktion und die HCV Replikation reduziert (Chin and Cresswell, 2001; Helbig et al., 2005). Es stellte sich die Frage, ob das durch die VSV Infektion induzierte Viperin auch antivirale Aktivität gegen VSV



**Abb.31 Viperin inhibiert die VSV Replikation**

NIH3T3 Zellen wurden mit einem Viperin Expressionsvektor (Vig1) oder einem Kontrollvektor (Mock) transient transfiziert. 24h nach der Transfektion erfolgte die Infektion für 1h mit VSV. Der Virustiter entspricht der Anzahl an Viren pro ml Überstand, welche innerhalb von 24h neu gebildet wurden.

Besitzt. Um diese Frage zu beantworten, wurden NIH3T3 Zellen mit einem Viperin Expressionsvektor transient transfiziert, um die Auswirkungen der Viperin Induktion auf die VSV Replikation untersuchen zu können. Die Expression von Viperin bewirkt eine über  $1 \times 10^9$  fache Reduktion des Virustiters im Vergleich zu NIH3T3 Zellen, die einen Kontrollvektor exprimieren (Abb.31). Dieser Replikationstest zeigt, dass die Expression von Viperin eine sehr starke Reduktion der VSV Replikation zur Folge hat.



### 3. Diskussion

Der Transkriptionsfaktor IRF-1 ist ein multifunktionelles Mitglied der IRF-Familie, der antivirale, antiproliferative und tumorsuppressive Eigenschaften besitzt (Kröger et al., 2002). In seiner Funktion als transkriptioneller Aktivator induziert IRF-1 eine Reihe von Genen, wobei die Genprodukte der primären IRF-1 Zielgene an der Expression weiterer Gene mitwirken. Nur für einige, hauptsächlich direkt regulierte, IRF-1 Zielgene ist bekannt an welchem IRF-1 Effekt sie beteiligt sind. Um die vielfältigen Wirkungen von IRF-1 zu verstehen, müssen aber auch die indirekt regulierten Gene mit einbezogen werden. Die Aufklärung der verschiedenen Wirkmechanismen von IRF-1 könnte wichtige Erkenntnisse für die Therapie humaner Tumore und viraler Infektionen liefern. Dazu wurden die Genexpressionsprofile eines Zellkulturmodells untersucht, indem sowohl die Onkogen vermittelte Transformation als auch die IRF-1 Aktivität separat reguliert werden kann. Auf diese Weise konnten 83 direkt regulierte und 1630 indirekt durch IRF-1 regulierte Gene identifiziert werden. Anschließend wurde die Bedeutung einzelner Gene für die antiproliferativen bzw. antiviralen Effekte analysiert. Dabei wurde nachgewiesen, dass die Normalisierung der erhöhten Zyklin D1 Expression für die IRF-1 vermittelte Proliferationsinhibition und die Reversion des transformierten Phänotyps von c-myc/c-H-ras exprimierenden Zellen essentiell ist. Desweiteren konnte CDK2 als potentiell Ziel der IRF-1 vermittelten Zellzyklus Regulation definiert werden. Dieser Zyklin D1 unabhängige Mechanismus spielt in dem untersuchten Zellsystem allerdings nur eine untergeordnete Rolle. Desweiteren konnte aufgezeigt werden, dass viele von den Genprodukten der direkten IRF-1 Zielgene an der Abwehr von Pathogenen mitwirken. Eines dieser Gene ist Viperin, ein ISG mit antiviraler Aktivität. Bei der Analyse der Frage, welche Rolle IRF-1 bei der Virus vermittelten Viperin Induktion spielt, wurden erste Hinweise dafür gefunden, dass IRF-1 besonders dann für die Etablierung antiviraler Mechanismen wichtig ist, wenn das IFN System durch Viren inhibiert wird. In den folgenden Kapiteln werden die erzielten Ergebnisse ausführlich diskutiert.

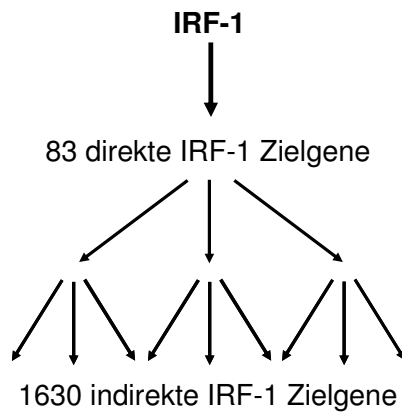
#### 3.1. IRF-1 regulierte Gene

Alle bereits erwähnten IRF-1 Effekte sind letztendlich auf eine transkriptionelle Regulierung primärer IRF-1 Zielgene zurückzuführen. Mit Hilfe von Genexpressionsanalysen konnten 83 primäre IRF-1 Zielgene identifiziert werden (Anhang, Tabelle 2), darunter 18 bereits beschriebene direkte IRF-1 Zielgene wie IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , GBP1/2/3, CCL5 und die MHC Klasse I Proteine (Anhang, Tabelle 2). In dieser Analyse kommen nicht alle der bisher beschriebenen

direkten IRF-1 Zielgene vor. Dafür gibt es mehrere Ursachen: (I) Die Signalstärken der Gene nehmen zwar nach der Aktivierung von IRF-1 zu, aber der Signalschwellenwert von 50 wurde nicht überschritten. Dies gilt beispielsweise für IL-7 und TRAIL. (II) Einige der IRF-1 Zielgene werden in Fibroblasten nicht exprimiert oder benötigen neben IRF-1 noch weitere Stimulatoren z.B. IL-4 und p21. (III) Die mRNAs einiger IRF-1 regulierter Gene können mit dem MG-U74A Chip nicht detektiert werden. Dazu zählen die mRNAs der 2'-5'-OAS Gene und die von IL-12.

IRF-1 aktiviert die Transkription seiner direkten Zielgene indem es an ein IRF-E genanntes Promotorelement bindet (Tanaka et al., 1993). Bei 37 der noch nicht als IRF-1 reguliert beschriebenen Gene konnte mindestens ein IRF-E im Promotor identifiziert werden (Tabelle 3). Die Promotoren dieser Gene werden wahrscheinlich direkt über die Interaktion mit IRF-1 induziert. In einigen Promotoren konnten „estrogen response elements“ (EREs) identifiziert werden, über die der Östrogenrezeptor (ER) seine Zielgene induziert. Eine transkriptionelle Aktivierung über die hER Domäne des IRF-1hER Fusionsproteins wurde jedoch ausgeschlossen, da dem Konstrukt die DNA Bindedomäne (DBD) des Rezeptors fehlt (Kirchhoff et al., 1993; Kumar et al., 1986). Weitere 28 Gene besitzen keine IRF-1 Bindestelle im untersuchten Promotorbereich. Sie werden aber trotz Translationsinhibition durch IRF-1 induziert. Es wäre daher möglich, dass bei diesen Genen die IRF-1 Bindungsstellen außerhalb des untersuchten Promotorbereichs liegen. Es könnte aber auch sein, dass IRF-1 mit anderen Proteinen interagiert, die bereits vor der CHX Behandlung gebildet wurden, um die Transkription dieser Gene zu induzieren. Eine solche Interaktion ist beispielsweise mit p300 beschrieben. Die Bindung von IRF-1 stimuliert die p300 vermittelte Acetylierung des Transkriptionsfaktors p53, was zur Stabilisierung des p53 Proteins und zu einer Steigerung der p53 Aktivität führt (Dornan et al., 2004). Auf diesem Weg verstärkt IRF-1 die Transkription von p53 induzierten Genen ohne eine direkte Interaktion mit dem Promotor einzugehen.

Mit 1630 Genen sind 48h nach der Aktivierung von IRF-1 rund 20 Mal mehr Gene differentiell reguliert, als primäre IRF-1 Zielgene identifiziert wurden (Tabelle 1 und Anhang, Tabelle 2). Gene, deren Expression indirekt durch IRF-1 reguliert wird, machen damit den größten Teil der nach 48h IRF-1 Aktivität regulierten Gene aus. Ihre Expression wird durch die Genprodukte primärer IRF-1 Zielgene reguliert, die als Transkriptionsfaktoren agieren oder die Aktivität bestimmter Signalkaskaden verändern (Abb.32). So induziert IRF-1 den Transkriptionsfaktor CIITA, der wiederum die Expression der MHC Klasse II Moleküle induziert (Hobart et al., 1997). Zu den direkten IRF-1 Zielgenen gehören auch solche, die für Zytokine wie IFN- $\alpha$ ,



**Abb.32 Schematische Darstellung der Regulationskaskaden direkter und durch IRF-1 indirekt regulierter Gene**

Die Pfeile stehen für die Induktion (→) bzw. Repression (⊣) von Genen.

IFN- $\beta$  und IL-12 kodieren (Fujita et al., 1988; Harada et al., 1989; Liu et al., 2003). Sie werden von den Zellen sekretiert und aktivieren durch die Interaktion mit ihren Zellrezeptoren Signalkaskaden, die zur Induktion weiterer Gene führen. In c-myc, c-H-ras transformierten Zellen inhibiert IRF-1 die Aktivität des Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) Signalweges und trägt damit entscheidend zur Reversion des transformierten Phänotyps bei (Abb.11). Welche der primären IRF-1 Zielgene an der Inhibition des MAPK Signalweges beteiligt sind konnte nicht geklärt werden.

### 3.2. Antiproliferative und tumorsuppressive IRF-1 Effekte

Unkontrolliertes Wachstum und Verlust der Kontaktinhibition sind zwei entscheidende Eigenschaften, die Aussagen über das Ausmaß einer onkogenen Transformation liefern. IRF-1 inhibiert die Proliferation verschiedener Tumorzelllinien, verhindert deren kontaktunabhängiges Wachstum und revertiert auf diese Weise den transformierten Phänotyp der Zellen (Kröger et al., 2003; Kröger et al., 2001; Tanaka et al., 1994b). Zwar vermittelt IRF-1 auch in nicht-transformierten Zellen einen antiproliferativen Effekt, dieser ist jedoch erheblich schwächer als in transformierten Zellen (Kirchhoff et al., 1993; Kröger et al., 2003). Somit scheint IRF-1 größtenteils solchen Mechanismen entgegenzuwirken, die nur in transformierten Zellen existieren. Mit Hilfe des myc/rasNIH3T3IH Zellsystems ist es möglich den nicht-transformierten und transformierten Zustand in einer Zelllinie zu untersuchen. Durch die Verwendung des aktivierbaren IRF-1hER Fusionsproteins kann zusätzlich die IRF-1 Wirkung untersucht werden. Genexpressionsanalysen zeigen, dass die Expression der Onkogene c-myc und c-H-ras bei 1347 Genen zu einer veränderten Transkription führt (Anhang, Tabelle 1). Innerhalb von 48h wird die Transkription von 834 (60%) dieser deregulierten Gene durch IRF-1 normalisiert (Abb.6). Die Große Anzahl der so regulierten Gene lässt vermuten, dass IRF-1 zentrale Regulatoren der myc/ras Signalkaskaden beeinflusst

(Abb.32). Die durch IRF-1 normalisierten Gene kodieren für eine Vielzahl von Genprodukten, die an der Regulierung des Zellzyklus beteiligt sind (Tabelle 2). Dies lässt den Schluss zu, dass die antiproliferativen Effekte von IRF-1 entscheidend zur Reversion des transformierten Phänotyps beitragen.

Die Aktivierung von IRF-1 führt zu einem erhöhten Anteil von Zellen in der G1 Phase (Abb.8) (Kirchhoff et al., 1995; Kröger et al., 2003). Nach der Aktivierung von IRF-1 sind fast alle Zellen in der Lage sich zu teilen (Abb.9), daher handelt es sich nicht um einen strikten G1 Arrest, sondern um eine verlängerte Aufenthaltsdauer in der G1 Phase (Abb.9). Dafür wären zwei Ursachen vorstellbar: (I) IRF-1 bewirkt ein kurzfristiges Abgleiten der Zellen in die Seneszenz (Go Phase), bevor sie in eine neue Zellzyklusrunde eintreten. (II) IRF-1 greift in die Regulationsmechanismen der G1 Phase ein, so dass der G1 Kontrollpunkt mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit überschritten wird.

In seiner Funktion als Transkriptionsfaktor induziert IRF-1 eine Reihe von Zellzyklus-regulierenden Proteinen, wie PKR (Koromilas et al., 1992), 2'-5' OAS (Benech et al., 1987) und die Lysyl Oxidase (Tan et al., 1996). Ihre Bedeutung für die antiproliferativen und tumorsuppressiven IRF-1 Effekte wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Bereits publizierte Daten und unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe H. Hauser zeigen, dass die Wirkung dieser Proteine nicht ausreicht um den IRF-1 Phänotyp zu erklären (Contente et al., 2003; Kirchhoff et al., 1995).

Durch die Genexpressionsanalysen konnten weitere Zellzyklus-regulierende Proteine identifiziert werden, deren Expression aber größtenteils indirekt reguliert wird (Tabelle 2). Die IRF-1 bedingte Akkumulation der Zellen in der G1 Phase lenkte das Interesse auf Proteine, die an der Regulation der G1 beteiligt sind und deren Expression durch IRF-1 reguliert wird. Dazu gehören die einzelnen Untereinheiten der ZyklinD/CDK4(6) und ZyklinE/CDK2 Komplexe aber auch ihre Inhibitoren p21 und p27. ZyklinD/CDK4(6) und ZyklinE/CDK2 phosphorylieren gemeinsam den Tumorsuppressor pRB, wodurch es zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F kommt (Harbour and Dean, 2000; Ishida et al., 2001). Die Genprodukte der durch E2F stimulierten Gene ermöglichen den Übergang von der G1 in die S Phase, sie werden aber auch für das Durchlaufen der S Phase benötigt (Sherr and Roberts, 2004). Eines der Gene, dessen Expression durch die Onkogene c-myc und c-H-ras induziert und durch die Aktivierung von IRF-1 wieder normalisiert wird ist Zyklin D1. Die Überexpression von Zyklin D1 führt zum Verlust der Zellzykluskontrolle (Hall and Peters, 1996; Sicinski et al., 1995) und wird mit der Entstehung humaner Tumore in Verbindung gebracht (Lee et al., 2000; Robles et al., 1996; Wang et al., 1994). Daher wurde geprüft, ob die IRF-1 vermittelte

Normalisierung der erhöhten Zyklin D1 Expression für die antiproliferativen IRF-1 Effekte essentiell ist. In normalen Zellen unterliegt die Zyklin D1 Expression einer sehr strikten Kontrolle. Diese kann über die Aktivierung des Promotors, die mRNA Stabilität, die Translationseffizienz oder die Proteinstabilität stattfinden. Die Regulierung auf mRNA Ebene erfolgt beispielsweise durch AU-reiche Elemente im 3' UTR. So führt die Interaktion mit Prostaglandin A2 zur Stabilisierung der Zyklin D1 mRNA, wohingegen die Bindung von Phosphatidylinositol-3-kinase genau den entgegengesetzten Effekt bewirkt (Dufourny et al., 2000; Lin et al., 2000). qRT-PCR Daten und Reportergenversuche zeigen, dass die Transkription des Zyklin D1 Genes in myc/ras transformierten Zellen stark erhöht ist und durch die Aktivierung von IRF-1 normalisiert wird (Abb.10). Die daraus resultierende Reduktion der Zyklin D1 Proteinkonzentration führt zur Verringerung aktiver ZyklinD/CDK4 Komplexe und zur Abnahme der pRB Phosphorylierung (Abb.12). Da die Phosphorylierung von pRB für die Funktionalität des Transkriptionsfaktors E2F essentiell ist, könnte die reduzierte Expression von E2F Zielgenen zur Verlängerung der G1 Phase führen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die IRF-1 vermittelte Reduktion von Zyklin D1, durch die Expression einer gegen Zyklin D1 gerichteten short-hairpin (sh)RNA, simuliert. Die shRNAs bewirkten in den myc/ras transformierten Zellen dieselben Effekte wie IRF-1. Neben der Akkumulation von Zellen in der G1 Phase konnte eine Proliferationsinhibition und die Reversion des Transformierten Phänotyps beobachtet werden (Abb.13). Auf diese Weise wurde bewiesen, dass IRF-1 über die Reduktion der erhöhten Zyklin D1 Expression die Veränderungen im Zellzyklus und die Reversion des transformierten Phänotyps vermittelt. Damit ist auch geklärt, welche Ursache die verlängerte Aufenthaltsdauer in der G1 Phase hat. IRF-1 greift in die Regulationsmechanismen der G1 Phase ein und verringert so die Wahrscheinlichkeit eines Übergangs von der G1 in die S Phase.

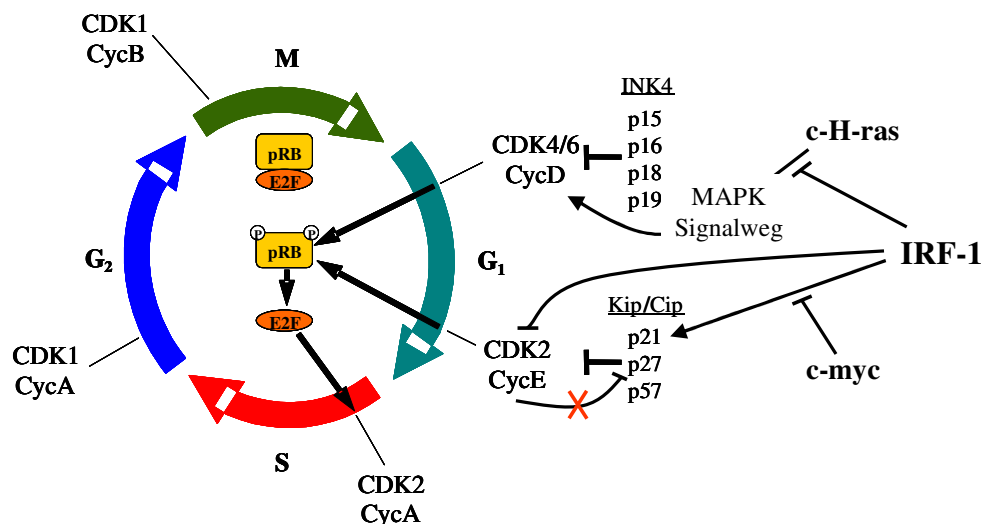
Wenn es gelingen würde die IRF-1 Aktivität in Tumorzellen durch Pharmazeutika zu stimulieren, wäre eine Reduktion der Zyklin D1 Konzentration zu erwarten. Somit könnte die Induktion von IRF-1 eine wirksame Strategie bei der Therapie von Tumoren sein, deren Onkogenität auf eine erhöhte Zyklin D1 Expression zurückzuführen ist. In humanen Darmkrebszellen konnte bereits gezeigt werden, dass die Reduktion der Zyklin D1 Konzentration zur Inhibition der Proliferation und zur Reversion des transformierte Phänotyps führt (Arber et al., 1997).

### 3.2.1. Zyklin D1 unabhängige IRF-1 Effekte

In c-myc/c-H-ras transformierten Zellen ist die Normalisierung der erhöhten Zyklin D1 Expression entscheidend für die antiproliferativen und tumorsuppressiven Effekte von IRF-1. Diese Effekte lassen sich aber auch in einigen Tumorzelllinien beobachten, in denen IRF-1 die Überexpression von Zyklin D1 nicht überkommen kann (Kröger A., persönliche Mitteilung). Außerdem führt die Aktivierung von IRF-1 in myc/rasNIH3T3IH Zellen, in denen das Zyklin D1 Protein durch shRNAs fast vollständig eliminiert wurde, zu einem Anstieg von Zellen in der G1 Phase (Abb.13). Somit muss es neben der Regulierung von Zyklin D1 noch weitere IRF-1 induzierte Mechanismen geben, die an der IRF-1 vermittelten Reversion der Transformation und an der Regulierung des Zellzyklus beteiligt sind. Diese Mechanismen sind im myc/rasNIH3T3IH Zellsystem zwar von untergeordneter Bedeutung, sie könnten aber in solchen Tumorzellen greifen, in denen IRF-1 keinen oder nur wenig Einfluss auf die Zyklin D1 Expression hat. Die Überexpression der Onkogene c-myc und c-H-ras führt in NIH3T3IH Zellen zu einem Anstieg der CDK2 Proteinkonzentration. IRF-1 wirkt diesem Effekt entgegen und normalisiert die CDK2 Proteinmenge (Abb.14). Erst kürzlich konnte eine Repressordomäne im IRF-1 Protein identifiziert werden, über die IRF-1 an den CDK2 Promotor bindet und ihn reprimiert (Eckert et al., 2006). Die IRF-1 vermittelte Reduktion der CDK2 Expression kann aber auch über die Destabilisierung von SP1 erfolgen (Xie et al., 2003). Kinaseaktivitätstests haben gezeigt, dass IRF-1 nicht nur die CDK2 Proteinmenge reduziert, sondern auch die Aktivität der CDK2 Kinase verringert (Abb.14). Die Reduktion der CDK2 Proteinkonzentration konnte als Ursache für die Inaktivierung der CDK2 Kinase ausgeschlossen werden, da die Kinaseaktivität viel früher abnimmt als die Proteinkonzentration (Abb.14). Die Überexpression einer dominant negativen Form der CDK2 Kinase (dnCDK2) bewirkt einen starken Anstieg von Zellen in der G1 Phase (van den Heuvel and Harlow, 1993). Somit könnte die Akkumulation von transformierten Zellen in der G1 Phase auch über die IRF-1 vermittelte Reduktion der CDK2 Kinaseaktivität erfolgen. In diesem Fall wäre der Anstieg von Zyklin D1 shRNA exprimierenden Zellen in der G1 Phase (Abb.13) auf die Reduktion der CDK2 Kinaseaktivität zurückzuführen.

Dem Zellzyklusinhibitor p21 kommt eine wichtige Rolle bei der durch DNA Schäden verursachten Inhibition der CDK2 Kinaseaktivität zu. IRF-1 und p53 aktivieren gemeinsam die Transkription von p21 (Tanaka et al., 1996). In den Brustkrebszelllinien MDA-MB-468 und SK-BR-3 wird p21 ausschließlich durch IRF-1 induziert. Diese Induktion erfolgt p53 unabhängig, da das Protein in beiden Zelllinien mutiert ist und keine DNA Bindeaktivität aufweist (Pizzoferrato et al., 2004). In den myc/rasNIH3T3IH Zellen ist p21 nicht für die

Inaktivierung der CDK2 Kinase verantwortlich, da die p21 Expression nach der Aktivierung von IRF-1 unverändert bleibt (Kröger et al., 2003). Der Grund für die fehlende p21 Induktion könnte die Überexpression von c-myc sein, welches zusammen mit Miz1 (Myc interacting zinc-finger protein) die Expression von p21 inhibiert (Seoane et al., 2002). Der Zellzyklusregulator p27 inhibiert die Aktivität der ZyklinE/CDK2 Komplexe indem er direkt in der katalytischen Domäne von CDK2 bindet (Russo et al., 1996). Die Aktivierung von IRF-1 bewirkt in myc/ras transformierten Zellen einen Anstieg der p27 Proteinkonzentration (Abb.16). Zwischen p27 und CDK2 besteht eine Art Gleichgewicht. Hohe Mengen an p27 bewirken eine vollständige Inhibition der CDK2 Kinaseaktivität, während eine hohe CDK2 Aktivität zum vollständigen Abbau des p27 Proteins führt (Bartek and Lukas, 2001). Daher kommen für die IRF-1 vermittelte Akkumulation von p27 zwei Mechanismen in Frage: (I) IRF-1 induziert p27, welches dann die CDK2 Kinaseaktivität inhibiert. (II) IRF-1 inhibiert die CDK2 Kinaseaktivität über einen p27 unabhängigen Mechanismus, wodurch der proteosomale Abbau von p27 verringert wird und es zur Akkumulation des Proteins kommt. Der p27 Promotor besitzt mehrere IRF-Es, die mindestens 70% Homologie zur IRF-E Konsensussequenz aufweisen (Daten nicht gezeigt). Eine IRF-1 vermittelte transkriptionelle Induktion von p27 konnte mittels qRT-PCR und Northern Blot Analysen ausgeschlossen werden (Abb.17 und Daten nicht gezeigt). Daher wurde der Einfluss von IRF-1 auf post-translationelle Modifikationen des p27 Proteins untersucht. Diese haben entscheidenden Einfluss auf die Stabilität und die Lokalisierung von p27. Bei über 50% aller humanen Tumore wird eine drastische Reduktion der p27 Proteinkonzentration detektiert (Slingerland and Pagano, 2000). Die geringe p27 Konzentrationen resultiert in den meisten Tumorzellen aus einem verstärkten proteosomalen Abbau des Proteins (Cordon-Cardo et al., 1998; Loda et al., 1997; Slingerland and Pagano, 2000). Western Blot Analysen der myc/rasNIH3T3IH zeigen, dass die Menge an T187-phosphorylierten p27 in transformierten Zellen, durch die Aktivierung von IRF-1 auf das Niveau nicht-transformierter Zellen abgesenkt wird (Abb.20). Dadurch ist die p27 Ubiquitinylierung verringert (Abb.20) und die eingeschränkte Degradation führt zur Akkumulation der p27 Proteine. Somit ist die IRF-1 vermittelte Inhibition der CDK2 Aktivität für die Akkumulation der p27 Proteine verantwortlich. Versuche mit p27 shRNAs haben allerdings gezeigt, dass die erhöhten p27 Konzentrationen für die antiproliferativen und tumorsuppressiven IRF-1 Effekte in dem untersuchten Zellsystem nicht essentiell sind (Abb.22). In Abb.33 sind alle im Rahmen der Arbeit nachgewiesenen Interaktionen von IRF-1 mit den Regulatoren der G1 Phase nochmals schematisch dargestellt.



**Abb.33 Einfluss von IRF-1 auf den Zellzyklus c-myc, c-H-ras transformierter Zellen (Funk and Kind, 1997, abgeändert)**

Der eukaryotische Zellzyklus wird in vier Phasen (G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> und M) unterteilt. Jede Zellzyklusphase ist durch das Auftreten spezifischer Zyklin/CDK Komplexe (Cyc/CDK) gekennzeichnet, deren Aktivität durch Inhibitoren der INK4- und der Kip/Cip-Familie kontrolliert wird. In der G<sub>1</sub> Phase phosphorylieren sowohl die CycD/CDK4(6) Komplexe als auch die CycE/CDK2 Komplexe das Retinoblastenprotein (pRB), wodurch es zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F kommt. Die Expression der E2F regulierten Gene ist für den Übergang von der G<sub>1</sub> Phase in die S Phase essentiell. Bei den c-myc, c-H-ras transformierten Zellen findet keine Regulierung der G<sub>1</sub> Phase statt, wofür es zwei Gründe gibt. Zum einen vermittelt c-H-ras, über den MAPK Signalweg, eine konstitutive Expression von Zyklin D1 und zum anderen verhindert c-myc die Expression des Zellzyklusinhibitors p21. Wird IRF-1 in den Zellen überexprimiert, inhibiert es den MAPK Signalweg und reduziert auf diese Weise die Zyklin D1 Expression und die Bildung aktiver ZyklinD/CDK4 Komplexe. Außerdem wird die Aktivität der CDK2 Kinase gehemmt, wodurch sich der ZyklinE/CDK2 vermittelte Abbau des CDK2 Inhibitors p27 verringert. Somit befinden sich nach der Aktivierung von IRF-1 kaum noch katalytisch aktive Zyklin/CDK Komplexe in der Zelle, die pRb phosphorylieren könnten. Daher ist der Übergang in die S Phase stark verzögert.

### 3.3. Antivirale IRF-1 Effekte

Interferone (IFN) sind Zytokine, die von Virus infizierten Zellen produziert werden. Über die Induktion antiviraler Gene verhindern sie die Ausbreitung der Viren, bis die Mechanismen des erworbenen Immunsystems wirken, um das Pathogen vollständig zu eliminieren. IRF-1 ist an den IFN induzierten antiviralen Mechanismen beteiligt. Daher ist die IFN- $\alpha$  bzw. IFN- $\gamma$  vermittelte Inhibition der Virusreplikation in IRF-1 defizienten Mäusen beeinträchtigt (Kimura et al., 1994). Außerdem sind die IRF-1<sup>-/-</sup> Mäuse sensibler gegenüber EMCV und MVA Infektionen, als entsprechende w.t. Mäuse (Kimura et al., 1994; Schmitz et al., 2007).

Seine antiviralen Effekte vermittelt IRF-1 über die transkriptionelle Induktion von Genen, deren Genprodukte antivirale Eigenschaften haben. Mit Hilfe von Genexpressionsanalysen konnten 83 direkte IRF-1 Zielgene identifiziert werden (Anhang, Tabelle 2), von denen 39 an der Pathogenabwehr beteiligt sind (Tabelle 4). Eines dieser Gene kodiert für Viperin, ein evolutionär hoch konserviertes ISG. Viperin vermittelt antivirale Aktivität indem es die Replikation von HCMV (Chin and Cresswell, 2001), VSV-pseudotypisiertem HIV (Rivieccio



et al., 2006) und HCV (Helbig et al., 2005) hemmt. Der genaue Mechanismus ist bisher unbekannt. In HCMV infizierten Zellen wird die Expression von verschiedenen Strukturproteinen, die für den Zusammenbau und die Reifung der Viren notwendig sind, durch Viperin inhibiert (Chin and Cresswell, 2001). Die Überexpression einer Viperin cDNA führt in embryonalen Fibroblasten der Maus (MEFs) zu einer  $1 \times 10^9$  fachen Reduktion der VSV Replikation (Abb.31). Wie das folgende Rechenbeispiel zeigt, ist es unmöglich, dass diese starke Inhibition allein durch intrinsische Effekte hervorgerufen wird. Bei der Infektion der Kontrollzellen (ca.  $5 \times 10^5$ ) werden rund  $1 \times 10^{12}$  infektiöse Viren produziert. Das entspricht rund  $2 \times 10^6$  produzierten Viren pro Zelle. Bei der Infektion der Viperin überexprimierenden Zellen werden nur ca.  $1 \times 10^3$  infektiöse Viren produziert. Wenn Viperin nur solche Zellen schützt in denen es exprimiert wird, muss die Transfektionseffizienz bei fast 100% liegen, um eine so geringe Virusproduktion zu erklären. Tatsächlich lag die Effizienz je nach Experiment zwischen 20% und 25%. Somit muss Viperin auch bei solchen Zellen einen antiviralen Schutz auslösen, in denen es nicht überexprimiert wird. Denkbar wäre, dass Viperin sekretiert wird oder dass es zur Sekretion von Proteinen beiträgt, die ebenfalls antivirale Effekte vermitteln. In humanen Fibroblasten ist Viperin im endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert. Nach der Infektion mit HCMV ändert sich die Lokalisation und Viperin ist größtenteils im Golgi Apparat lokalisiert. Viperin wurde aber auch in zytoplasmatischen Vesikeln detektiert, die nicht genauer charakterisiert wurden (Chin and Cresswell, 2001). Falls es sich dabei um sekretorische Vesikel handelt, könnte Viperin über einen extrinsischen Mechanismus zum Schutz benachbarter Zellen beitragen.

Die Expression von ektopischem IRF-1 führt zur Erhöhung der Viperin mRNA Konzentration (Abb.24). Im Promotor des Viperin Gens konnten drei Sequenzbereiche mit mehr als 92% Homologie zur IRF-E Konsensussequenz identifiziert werden (Abb.25). EMSA (Electromobility shift assays) und Reportergenversuche haben gezeigt, dass IRF-1 an die beiden proximalen IRF-Es bindet und auf diese Weise die Promotoraktivität erhöht (Abb.25/26). Auch die Promotorbereiche des Mandarin-Fisch und des humanen Viperin Gens besitzen IRF-Es (Severa et al., 2006; Sun and Nie, 2004), was auf eine evolutionär konservierte Funktion von IRF-1 bei der transkriptionellen Aktivierung von Viperin hindeutet.

Quantitative RT-PCR Analysen haben gezeigt, dass Viperin nicht nur durch IRF-1, sondern auch durch IFNs (Typ I, Typ II) und ssRNA Viren (NDV, VSV) induziert wird (Abb.27). In pDCs erfolgt die IFN- $\beta$  vermittelte Viperin Expression über den ISGF3 Komplex, einem Heterotrimer aus STAT1/STAT2 und IRF-9, welches durch den JAK/STAT Signalweg aktiviert wird (Severa et al., 2006). In den Fibroblasten deutet der schnelle mRNA Anstieg,

nach der IFN- $\beta$  Behandlung, ebenfalls auf eine ISGF3 vermittelte transkriptionelle Induktion des Viperin Gens hin (Abb.27). Die IFN- $\gamma$  vermittelte Viperin Induktion erfolgt IRF-1 abhängig (Abb.29). IRF-1 wird in Folge der Aktivierung des Typ II IFN Signalwegs durch STAT1 Homodimere (GAF) transkriptionell induziert und aktiviert dann die Viperin Expression (Abb.34). Daher ist die IFN- $\gamma$  vermittelte Viperin Induktion nicht nur in IRF-1 defizienten, sondern auch in STAT1 defizienten Zellen inhibiert (Abb.27).

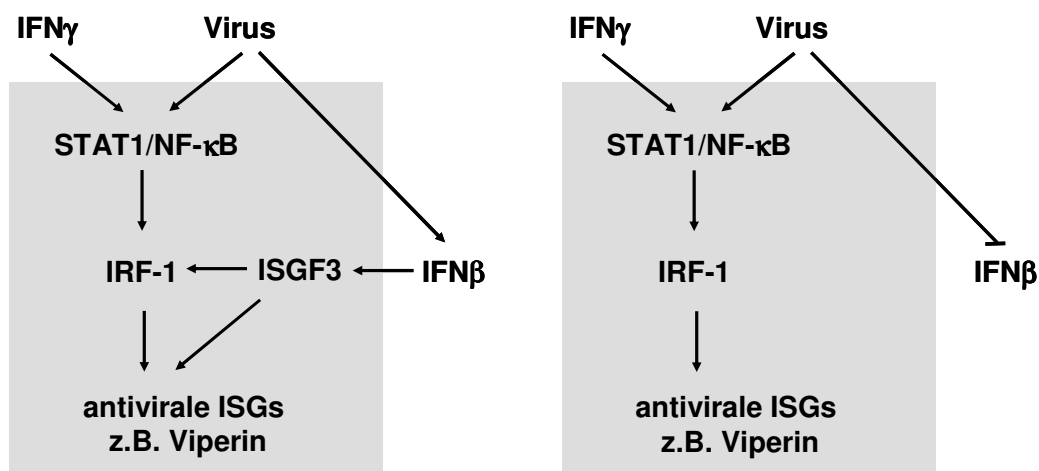
Einige Viren wie VHSV, HCMV und HCV induzieren die Viperin Expression unabhängig von Typ I IFNs, zum Teil über Glykoproteine der Virushülle (Boudinot et al., 1999; Chin and Cresswell, 2001; Helbig et al., 2005). VSV und NDV sind in der Lage die Viperin Expression in IFNAR defizienten MEFs zu induzieren (Abb.28). Dabei ist IRF-1 für die VSV vermittelte Viperin Expression essentiell (Abb.29). Weitere Daten lassen den Schluss zu, dass die VSV vermittelte Viperin Induktion nicht nur Typ I sondern auch Typ II und Typ III IFN unabhängig ist. (I) Bei allen untersuchten Zellen konnte nach der VSV Infektion kein sekretiertes IFN nachgewiesen werden. (II) Die Viperin mRNA Induktion bleibt auch in der Anwesenheit von IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  Antikörpern unverändert (Boudinot et al., 2000). (III) Die Produktion von IFN- $\gamma$  ist auf wenige Zelltypen beschränkt, dazu gehören T-Helferzellen Typ 1 (TH1), NK Zellen sowie CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Demzufolge kann eine IFN- $\gamma$  vermittelte Viperin Induktion ausgeschlossen werden. (IIII) Northern Blot und qRT-PCR Analysen haben gezeigt, dass in keiner der verwendeten Zelllinien eine VSV vermittelte IFN- $\lambda$  Induktion erfolgt (Daten nicht gezeigt).

Ein IFN unabhängiger antiviraler Mechanismus der von VSV ausgelöst wird beinhaltet IRF-3 (Paladino et al., 2006). Dieser Mechanismus erfordert die Aufnahme viraler Partikel, erfolgt aber unabhängig von der viralen Replikation. In IRF-3 defizienten Makrophagen ist die Viperin Expression infolge viraler Infektionen unverändert (Severa et al., 2006). Daher wurde davon ausgegangen, dass die IFN unabhängige Viperin Induktion in VSV infizierten Zellen nicht durch IRF-3, sondern durch IRF-1 vermittelt wird. Auch in Leberkarzinomzellen wurde ein IFN unabhängiger antiviraler Mechanismus gefunden. Er wird durch die Stimulation des TLR7 Rezeptors initiiert und limitiert die HCV Replikation (Lee et al., 2006).

Bezogen auf die IFN Induktion gehören NDV und VSV zu zwei sehr unterschiedlichen Kategorien von Viren. Während VSV die IFN Sekretion inhibiert, führt die Infektion mit NDV zur Ausschüttung großer IFN Mengen (Abb.30). Viele Viren haben im Laufe der Evolution Mechanismen entwickelt, um das IFN System zu blockieren (Haller et al., 2006). Bei der Infektion mit diesen Viren spielen die IFN unabhängigen antiviralen Mechanismen eine wichtige Rolle. Vergleichende Infektionsversuche mit dem im M-Protein mutierten VSV

Variante AV2 und dem w.t. Virus haben gezeigt, dass IRF-1 nur dann essentiell ist, wenn das Virus die IFN Produktion inhibiert (Abb.30). Im Gegensatz zum w.t. VSV ist dieses Virus nicht mehr in der Lage die IFN Bildung zu blockieren (Stojdl et al., 2003). Werden Zellen durch ein Virus infiziert, welches das IFN System nicht blockiert, wird eine fehlende IRF-1 Induktion durch den IFN Signalweg kompensiert (Abb.29).

Durch die hohe Ähnlichkeit der IRF-E und ISRE Konsensussequenzen gibt es eine starke Überlappung bei den Typ I ISGs und den direkten IRF-1 Zielgenen. Wichtige antivirale Gene wie 2'-5'-OAS, PKR und GBP können sowohl durch IFN- $\alpha/\beta$  als auch durch IRF-1 induziert werden. IRF-1 vermittelt aber auch IFN unabhängige antivirale Mechanismen. Dementsprechend kann das VSV Virus in IRF-1 defizienten Zellen besser replizieren als in den Kontrollzellen, obwohl VSV die IFN Synthese blockiert (Tabelle 5). Außerdem erhöht IRF-1 die Virusresistenz gegen ECMV, VSV und NDV in Anwesenheit von gegen IFN- $\alpha/\beta$  gerichteten Antikörpern (Pine, 1992). Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass IRF-1 unter bestimmten Umständen das IFN System ersetzt. Ein Modell der IRF-1 abhängigen Induktion antiviraler Gene in An- bzw. Abwesenheit von Typ I IFN ist in Abb.34 dargestellt.



**Abb.34 Modell der IRF-1 abhängigen Induktion antiviraler ISGs**

Die transkriptionelle Induktion von IRF-1 durch IFN- $\gamma$  und Viren erfolgt STAT1 und NF $\kappa$ B abhängig. Die IFN- $\beta$  abhängige Induktion der IRF-1 Expression wird durch den ISGF3 Komplex bewirkt. **(links)** Normalerweise produzieren Virus infizierte Zellen Typ I IFNs, wie IFN- $\beta$ . Das sekretierte IFN wirkt sowohl autokrin als auch prakin und induziert den JAK/STAT Signalweg, wodurch der ISGF3 Komplex aktiviert wird. Gleichzeitig kommt es zur Induktion von IRF-1. Es gibt eine starke Überlappung zwischen den IRF-1 und Typ I IFN regulierten Genen, weswegen viele antivirale Gene durch IRF-1 und durch den ISGF3 Komplex induziert werden. **(rechts)** Wird das Typ I IFN System durch das Virus gehemmt, können viele der antiviralen ISGs noch über IRF-1 induziert werden.

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Geräte

Analysenwaage	Sartorius analytic Sartorius universal
Autoklav	Belimed/Sauter Zirbus, HAST 32/25
Blottapparatur	Transblot SD Semi-Dry Biorad Invotrogen Xcell II Blot Module
CCD-Kamera	Photometrics, PXL1400 Nikon, Coolpix 4500
Cleanbenches	Mecaplex, Sterilcard Hood VBM600 und SG400 Heraeus, HLB 2448 Heraeus, HSP 18
Durchflusszytometer	FACScan von Becton Dickinson FACSCalibur von Becton Dickinson FACSVantage SE von Becton Dickinson Macintosh Quadra 650
Elektroporator	Biorad Gene Pulser und Pulse Controller
Fluoreszenz-Elisa-Reader	Wallace Victor2 1420 Multilabel counter Labsystems Multiskan
Fluorometer	Hoefer Dyna Quant 200
Horizontal-Elektrophorese	BRL Horizon 58 BRL Horizon 1114 BRL Horizon 2025
Hybridisierungsöfen	Stuart Scientific
Kühlzentrifugen	Sorvall Superspeed RC5-C mit Rotoren SS34, GSA Sorvall RT6000B Minifuge Heraeus-Christ, Biofuge fresco
Laborschüttler	Heidolph IKA-Schüttler MTS 4
Light Cyclers	Light Cyclers, Roche
Luminometer	Berthold Lumat LB 9501 Berthold Lumat LB 9507

Mikroskop	Olympus CK 2, Leitz Labovort, Zeiss Axiovert TV 135 mit Fluoreszenzvorrichtung Leica DMIL
Netzgeräte	Biorad Power Pac 300
Netzgeräte	Desaga Mains Power Supply Unit 1200/200
PCR-Maschinen	Biometra T3 Thermocycler Perkin Elmer DNA Thermal Cycler 480
pH-Meter	M 340, Beckmann
Phospho-Imager	Molecular Dynamics, Storm 860
Photometer	Hitachi U-1100 Thermo Elektron Corporation Multiscan Ex
Pipetten	Gilson, 10; 20; 200;1000 µl
Scintillationszähler	Liquid Scintillation and Luminescence Counter, Wallac, 1450 Mikrobeta Trilux
Vakuumzentrifuge (Speedvac)	Savant Instruments Inc. Mit Ölschieber-Vakuumpumpe und Kühlfalle Eppendorf, Concentrator 530
Thermoblock	IKA Labortechnik
Thermomixer	Eppendorf Thermomixer 5436
Tischzentrifugen	Minifuge Heraeus-Christ, Biofuge pico Eppendorf Centrifuge 5417C Hettich Rontanta/S Hettich Mikro 12-24
Ultrazentrifuge	Sorval Combi OTDC mit Rotoren Beckman T150, T10
UV-Kammer	Hanau
Vertikal-Elektrophorese	Biorad Mini Protean II Invitrogen Xcell SureLook™ Novex Mini-Cell
Vortex	Scientific Industries Vortex Genie 2
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore Milli-Q
Zellkultur-Inkubatoren	Forma Scientific Water-jacketed Incubator Modell 3336 Heraeus CO2-Auto-Zero
Zellzähler	Schärfe System Casy 1

## **4.2. Materialien**

Die Chemikalien werden von den Firmen Amersham, Bayer, Biolabs, Boehringer, Difco, Flow, Fluka, Gibco, Hoechst, Invitek, Macherey-Nagel, Merck, Peqlab, Pharmacia, Promega, Qiagen, Serva, Sigma, Stratagene und USB bezogen. Die Enzyme liefern Amersham-Buchler, BRL, Biolabs, Boehringer, Pharmacia, Roche Pharma, Cell Signalling Technology und USB. Oligonukleotidsynthesen werden von der Firma MWG durchgeführt.

Das Plastik-Zellkulturmaterial für die eukaryontischen Zellen wird von den Firmen Costar, Gibco, Greiner, Nunc und Seromed bezogen.

Die Texte, Grafiken und Tabellen in dieser Arbeit wurden mit den Programmen Word, Powerpoint, Excel und Access der Firma Microsoft erstellt. Die Auswertung der „DNA-Microarray“ Analysen erfolgte mit den frei erhältlichen Programmen „TIGR Multiple Experiment Viewer“, (Saeed et al., 2003) und „GOSurfer“ (Zhong et al., 2004). Die Bearbeitung von Bilddateien erfolgte mit dem Programm Photoshop 5.0 der Firma Adobe. Zur Entwicklung von Klonierungsschritten, zum Auffinden von PCR-Primer-Sequenzen und zur Restriktionskartierung wurde das Programm Vector NTI 5.0 der Firma ATCC verwendet. Die Auswertung der Light Cycler Daten erfolgte mit LightCycler® Software Version 3.5. Für Promotoranalysen wurde das auf TRANSFAC, IMD und der CBIL-GibbsMat Datenbank basierende Programm TESS verwendet (<http://www.cbil.upenn.edu/tess>).

## **4.3. Sterilisation**

### **4.3.1. Sterilisation durch Hitze**

Glasgeräte werden 4 h bei 180°C im Trockenschrank sterilisiert. Jegliche Materialien aus Plastik wie Eppendorffgefäße und Pipettenspitzen, Lösungen und Holzstäbe werden 25 min bei 121°C autoklaviert.

### **4.3.2. Sterilisation durch Filtration**

Lösungen, die nicht autoklaviert werden können, werden mit Filtern mit einer Porengröße von 2 µm (Sartorius) sterilisiert.

## 4.4. Arbeiten mit E.coli

### 4.4.1. Verwendete Stämme

XL1-Blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F' proAB, lacIqZM15, Tn10, (tet <sup>r</sup> )]
DH10B	F', mcrA <sup>-</sup> -(mrr hsdRMS-mcrBC), $\Phi$ 80dlacZM15, lacX74, deoR, recA1, ara139, (ara, leu)7697, galU, galK, $\lambda$ -, rpsL, end A1, nupG (Gibco BRL)
TOP10	F- mrcA $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) $\Phi$ 80dlacZM15, $\Delta$ lacX74 recA1 araD139 $\Delta$ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str <sup>R</sup> ) endA1 nupG

### 4.4.2. Kulturmedien für Bakterien

LB-Medium	10 g/l Bacto-Trypton, 10 g/l Bacto-Hefeextrakt, 5 g/l NaCl
Ampicillin	50 mg/ml Ampicillin in Ethanol, sterilfiltriert
Kanamycin	100 mg/ml Kanamycin in H <sub>2</sub> O, sterilfiltriert
S.O.C. Medium	Invitrogen, Bestandteil des „PCR Cloning Kit, pCR3.1 bidirectional“ enthält: 20 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto-Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 20 mM Glucose

### 4.4.3. Herstellung von Agarplatten

Es werden 15 g Agar (Difco) zu 1 l LB-Medium gegeben und aufgekocht. Nach Abkühlen der Agar-Lösung werden für Ampicillin-haltige Agarplatten 1 ml Ampicillin-Lösung (50 mg/ml), für Kanamycin-haltige Platten 0.5 ml Kanamycin-Lösung (100 mg/ml) zur Agarlösung gegeben und auf Bakterienplatten verteilt.

### 4.4.4. Herstellung elektrokompeter Bakterien

Die Bakterien werden in 5 bis 10 ml LB-Medium unter Schütteln (180 rpm) bei 37°C über Nacht vorkultiviert. Am nächsten Tag wird die Bakterienkultur zu 1 l LB-Medium gegeben und abermals unter Schütteln (180 rpm) bei 37°C kultiviert. Die Kultivierung wird beendet, wenn die Bakteriensuspension einen O.D. Wert von 0.6 bis 0.8 (exponentielle Wachstumsphase) bei 600 nm erreicht. Anschließend wird die Bakteriensuspension in vorgekühlte Zentrifugenbecher gegeben und die Bakterien durch 10 minütige Zentrifugation bei 3000 rpm (GS3-Rotor) und 4°C pelletiert. Nach Resuspension in kaltem, sterilem Wasser und wiederholter Zentrifugation

werden die Bakterien in 20 ml kalter, 10%iger Glycerin-Lösung aufgenommen und 15 min bei 3500 rpm (SS34-Rotor) und 4°C zentrifugiert. Die Bakterien werden anschließend in 2 bis 3 ml kalter, 10%iger Glycerin-Lösung resuspendiert, in Aliquots zu 50 µl in Eppendorf-Gefäße überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. Anschließend kann die Kompetenz der Bakterien mit der Transformation eines Standardplasmids bestimmt werden.

#### **4.4.5. Elektrotransformation kompetenter Bakterien**

Es werden 50 µl kompetente Bakterien aufgetaut, auf Eis gestellt, mit ca. 1 µl verdünnter DNA-Lösung oder Ligationsansatz vermischt und in eine vorgekühlte Transformationsküvette mit 0.2 cm Elektrodenabstand gegeben. Diese wird in der Gene-Pulser-Apparatur einem elektrischen Feld (2.5 kV, 25 µF, 200 Ω) ausgesetzt. Die Impulsdauer sollte bei 4 bis 5 ms liegen. Sofort nach Transformation werden die Bakterien in 1 ml S.O.C. Medium aufgenommen und 30 min unter Schütteln (180 rpm) bei 37°C inkubiert. Anschließend werden Aliquots der Bakterienkultur auf Agarplatten mit Selektionsmedium ausplattiert und diese über Nacht bei 37°C bis zur Klonbildung kultiviert.

#### **4.4.6. Konservierung von Bakterien**

Zur kurzfristigen Lagerung werden Bakterien mit einer Impföse auf Agarplatten ausgestrichen. Nach Inkubation der Platte bei 37°C über Nacht wird diese bei 4°C aufbewahrt. Für eine langfristige Lagerung werden Bakterien über Nacht in LB-Medium unter Schütteln (180 rpm) bei 37°C kultiviert. Die Bakteriensuspension wird im Verhältnis 1:1 mit 87%iger Glycerin-Lösung vermischt und in Glasgefäßen bei -20°C oder -70°C aufbewahrt.

### **4.5. Arbeiten mit eukaryontischen Zelllinien**

#### **4.5.1. Verwendete Zelllinien und Viren**

NIH3T3	embryonale Mausfibroblasten-Zelllinie, ATCC CRL-1658, NIH/Swiss
35/1-22 EK3	NIH3T3 Zellen mit c-myc und c-H-ras unter der Kontrolle eines Tetrazyklin regulierbaren Promoters und konstitutiv expremierten IRF-1hER (Kröger et al., 2003)



STAT1 <sup>-/-</sup>	embryonale Fibroblasten-Zelllinie aus STAT1 <sup>-/-</sup> Mäusen isoliert (von M. Müller, Veterinärmedizinische Universität Wien, Österreich)
IFNAR <sup>-/-</sup>	embryonale Fibroblasten-Zelllinie aus IFNAR <sup>-/-</sup> Mäusen isoliert (von R. Zawatsky, DKFZ Heidelberg, Deutschland)
IRF-1 <sup>-/-</sup>	embryonale Fibroblasten-Zelllinie aus IRF-1 <sup>-/-</sup> Mäusen isoliert (von T. Decker, Universität Wien, Österreich)
IRF-1 <sup>-/-</sup> ARLT	embryonale Fibroblasten-Zelllinie aus IRF-1 <sup>-/-</sup> Mäusen isoliert und mit dem Simian Virus 40 Large T Antigen (Tag) konditional immortalisiert (Immortalisierung durchgeführt durch Tobias May, HZI Braunschweig, Deutschland)
IRF-1 <sup>+/-</sup> ARLT	embryonale Fibroblasten-Zelllinie aus IRF-1 <sup>+/-</sup> Mäusen isoliert und mit dem Simian Virus 40 Large T Antigen (Tag) konditional immortalisiert (Immortalisierung durchgeführt durch Tobias May, HZI Braunschweig, Deutschland)
LMTK <sup>-</sup>	stabile Fibroblasten-Zelllinie, Derivat der L929 Zelllinie mit defektem Thymidinkinasegen und BudR-Resistenz, ATCC CCL-1.3TM, C3H/An
VSV	Vesikular Stomatitis Virus, Rhabdoviridae
AV2	VSV Stamm mit einem mutiertem M Protein (Stojdl et al., 2003)
NDV	Newcastle Disease Virus, Paramyxoviridae

#### 4.5.2. Grundmedien und Medienzusätze

DMEM-Grundmedium (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium)

13.63 g/l DMEM-Pulver; 3.67 g/l (44mM) NaHCO<sub>3</sub>;  
2.6 g/l (10mM) HEPES; pH 7.2

PBS (Phosphate buffered saline)

140 mM NaCl; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O; pH 6,8 – 7,0

TEP

6 mM EDTA, 0.1-0.2% Trypsin (Gibco) in PBS

100x Pen/Strep

6,06 mg/ml Ampicillin (10000 U/ml), 10 mg/ml  
Streptomycin (10mg/ml), zum Lösen mit NaOH auf  
pH7.4 einstellen (Lagerung bei -20°C)

100x Glutamin

29,23 mg/ml Glutamin (Lagerung bei -20°C)

FCS

JRH Bioscience (östrogenfrei)

Biochrom AG (östrogenfrei)

BioWest

G418	100 mg/ml G418 in H <sub>2</sub> O, sterilfiltriert, (Lagerung bei –20°C)
Histidinol	1 M Histidinol in H <sub>2</sub> O, sterilfiltriert, (Lagerung bei –20°C)
Polybrene	4 mg/ml in H <sub>2</sub> O, sterilfiltriert

#### 4.5.3. Kulturmedien

Vor Gebrauch wird dem Medium 10 % (v/v) FCS sowie 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycinlösung und Glutamin zugesetzt und gut gemischt. Um 5+ DMEM herzustellen werden dem gebrauchsfertigen DMEM essentielle Aminosäuren (Gibco; Endkonzentration 1x) und 0.1% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol zugesetzt.

Kultivierung in DMEM: NIH3T3, 35/1-22 EK3, STAT1<sup>-/-</sup>, IFNAR<sup>-/-</sup>, IRF-1<sup>-/-</sup>, LMTK<sup>-</sup>

Kultivierung in 5+DMEM: IRF-1<sup>-/-</sup> ARLT, IRF-1<sup>-/+</sup> ARLT

Folgende Selektionszusätze werden gegebenenfalls bei der Etablierung und Haltung stabil transfizierter Zelllinien ins Medium gegeben:

500-1000  $\mu$ g/ml G418 (Neomycin) von PAA Laboratories gelöst in Wasser

1-8  $\mu$ g/ml Puromycin von Sigma gelöst in Wasser

150 U/ml Hygromycin B von Calbiochem

Als Induktor wird  $\beta$ -Östradiol von Boehringer Ingelheim gelöst in 50% Ethanol in einer Endkonzentration von 1  $\mu$ M dem Zellkulturmedium für 24-72h zugesetzt. Die Interferon Induktion von murinen Zelllinien wird mit 500 U/ml IFN- $\gamma$  (PeproTechInc.) und 500 U/ml IFN- $\beta$  (rekombinantes IFN- $\beta$ , das durch transfizierte BHK-Zellen sekretiert wird) für 0-24 h durchgeführt. Zur Regulierung der Tet-abhängigen Promotoren wird 2 $\mu$ g/ml Doxozyklin zum Zellkulturmedium gegeben.

#### 4.5.4. Kultivierung von Säugerzellen

Die Zellen werden in geeigneten Kulturgefäßen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einem nassbegasteten Brutschrank in entsprechendem Medium kultiviert. Je nach Zelldichte wird nach 2 bis 5 Tagen

das Medium gewechselt. Spätestens nach Erreichen der Konfluenz werden die Zellen passagiert. Zur Passagierung werden die Zellen mit PBS gewaschen und dann mit TE trypsiniert. Die Zellsuspension wird mit Zellkultur vermisch und auf neue Kulturgefäße verteilt.

#### **4.5.5. Zellzahlbestimmung**

Die Zellzahlbestimmung wird mit dem automatischen Zellzähler CASY1 durchgeführt. Dazu werden die Zellen 1:200 in ein Zählgefäß überführt. Soll neben der Zellzahl auch die Vitalität bestimmt werden, müssen die Zellen mittels Neubauer-Zählkammer nach vorheriger Trypan-Blau Färbung gezählt werden.

#### **4.5.6. Langzeitlagerung von Säugerzellen**

Exponentiell wachsende Zellen werden gewaschen, trypsiniert und pelletiert (1000 rpm, 5 min). Das Zellpellet wird in kaltem FCS mit 0.5% DMSO resuspendiert und auf Kryoröhrchen (Bio-Freeze-Vials, Fa. Costar) verteilt. Das Einfrieren erfolgt langsam durch 30 minütige Inkubation auf Eis, gefolgt von mindestens 24 h bei -70°C bevor die Zellen dauerhaft in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Das Auftauen der Zellen erfolgt zügig im Wasserbad (37°C). Zur Entfernung des DMSO werden die Zellen in Kulturmedium aufgenommen und zentrifugiert (1000 rpm, 5 min). Das Zellpellet wird in Kulturmedium resuspendiert und auf Kulturgefäße verteilt.

#### **4.5.7. Bestimmung der Proliferation**

Zur Bestimmung der metabolischen Aktivität werden je  $2 \times 10^3$  Zellen / 200 µl Medium in die oberste Reihe einer Mikrotiterplatte (0.32 cm<sup>2</sup> pro Loch) ausplattiert und 100 µl Medium in die anderen Reihen vorgelegt. Mit einer Multikanalpipette werden 100 µl entnommen, in die zweite Reihe gegeben und so wird bis zur letzten Reihe fortgefahren, um jeweils eine 1:2 Verdünnung zu erhalten. Nach 24 h werden 100 µl Medium ohne Zusatz (Kontrolle) oder mit 2 µM E2 zur Aktivierung des IRF-1hER Fusionsproteins auf die Zellen gegeben und diese für 7 – 9 Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Anzahl proliferierender Zellen wird mit einem colorimetrischen Assay basierend auf dem Abbau von WST-1 durch mitochondriale Dehydrogenasen in lebenden Zellen nachgewiesen. Nach Abschlagen des alten Mediums wird das WST-1 Reagenz, 1:10 verdünnt in Medium, auf die Zellen gegeben und für ca. 15 min im

Brutschrank inkubiert. Die Veränderungen der optischen Dichte werden bei 420 nm im ELISA-Reader gemessen.

#### **4.5.8. Formation von Weichagar-Kolonien**

Um den transformierten Status der Zellen zu untersuchen wurde das Kontakt-unabhängige Wachstum im Weichagar untersucht. Hierzu wurden in einer Mikrotiterplatte ( $0.32 \text{ cm}^2$  pro Loch)  $50 \mu\text{l}$  0,6% underlay Agar pro Loch vorgelegt, darauf  $1 \times 10^3$  Zellen in  $50 \mu\text{l}$  0,3% overlay Agar ausplattiert und einen Tag später mit  $50 \mu\text{l}$  Medium überschichtet. Die Zellen wurden ohne oder mit  $1 \mu\text{M}$  E2 für 7 Tage inkubiert und die Anzahl sowie Größe der Kolonien unter dem Mikroskop ermittelt.

#### **4.5.9. Infektion von Zellen**

Einen Tag vor der Infektion mit VSV, NDV oder AV2 werden  $0.8 \times 10^5$  Zellen auf einer 6-Lochplatte ( $9 \text{ cm}^2$  pro Loch) ausplattiert. Die Infektion erfolgt für 1h in Medium ohne FCS und ohne Antibiotika. Anschließend werden die Zellen 3x mit 10% FCS-haltigem Medium gewaschen. Danach wurden die Zellen für den gewünschten Zeitraum in 5% FCS-haltigem Medium kultiviert.

#### **4.5.10. Virustiterbestimmung**

NIH3T3 Zells werden mit pVBC-3mycVigGN oder einem Kontrollplasmid transient transfiziert. Die Infektion der Zellen wurde 24h nach der Transfektion wie in Kapitel 4.5.9. beschrieben durchgeführt. LMTK<sup>-</sup> Zellen ( $0.8 \times 10^5$  pro 96ger Loch) werden für 48 h mit dem konzentrierten Überstand bzw. Verdünnungen des Überstandes kultiviert, um die Zahl infektiöser Viren pro  $100 \mu\text{l}$  zu bestimmen. Dazu werden in die Löcher der ersten Reihe  $190 \mu\text{l}$ , in die anderen Reihen jeweils  $100 \mu\text{l}$  Medium (mit 5% FCS) vorgelegt.  $10 \mu\text{l}$  der zu analysierenden virushaltigen Überstände werden in die Löcher der ersten Reihe pipettiert. Mit einer Multikanalpipette wird gut durchmischt,  $100 \mu\text{l}$  entnommen und in die zweite Reihe gegeben. So fährt man fort und erhält jeweils eine 1:2-Verdünnung. Die Lyse der LMTK<sup>-</sup> Zellen zeigt an, dass sich infektiöse Partikel im Überstand befinden. Über die Verdünnungsreihen kann nun ausgerechnet werden, wie viele infektiöse Viren in  $100 \mu\text{l}$  des unverdünnten Überstandes zu finden sind.

## 4.6. Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren

### 4.6.1. Isolierung von Gesamt-RNA

Gesamt-RNA aus Zellen wird mit dem Rneasy Mini Kit von Qiagen gemäß den Anweisungen des Herstellers isoliert. Dieses System basiert auf den selektiven Bindungseigenschaften einer Silicagel-Membran, an welche bis zu 100 µg RNA mit einer Länge von über 200 bp gebunden werden können. Hierzu werden bis zu  $1 \times 10^7$  Zellen geerntet, in 350 µl oder 700 µl Mercaptoethanol-haltigem RLT-Puffer homogenisiert und mit 350 µl bzw. 700 µl 70% EtOH gemischt. Dieses Gemisch wird auf die Rneasy Säule gegeben, an der die Gesamt-RNA bindet. Nach einer Zentrifugation von 15 sec bei 10.000 rpm werden Verunreinigungen durch die Applikation von Waschpuffern entfernt. Die Elution der RNA erfolgt in 30-50 µl H<sub>2</sub>O.

### 4.6.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien im analytischen Maßstab

STET-Puffer	80 g/l Sucrose, 0.5% Triton X100, 50 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl (pH 8.0) in H <sub>2</sub> O
TE-Puffer	1mM EDTA, 10mM Tris/HCl in H <sub>2</sub> O, pH 7.5
Lysozym	10 mg/ml Lysozym in TE-Puffer
Ammoniumacetat	8 M NH <sub>4</sub> Oac in H <sub>2</sub> O
TE-Rnase	10 µg/ml Rnase A in TE-Puffer

Es werden 1,5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit den zu untersuchenden Bakterien angeimpft und diese für 12 bis 16 Stunden unter Schütteln (180 rpm) bei 37°C kultiviert. Die Bakterien werden in Eppendorfgefäßen 1 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert und anschließend in 500 µl STET-Puffer resuspendiert und mit 50 µl Lysozym-Lösung versetzt. Nach 2 bis 3 minütiger Inkubation bei RT werden die Bakterien 90 sec in einem 95°C heißen Thermoblock erhitzt und anschließend 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das zähflüssige Pellet wird mit Hilfe eines Zahnstochers entfernt. Die klare Lösung wird mit 50 µl Ammoniumacetat-Lösung und 500 µl Isopropanol vermischt und erneut 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Das DNA-Pellet wird nach kurzem Trocken bei RT in 50 bis 100 µl TE-Rnase-Lösung aufgenommen.

**4.6.3. Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab (Quiagen)**

Resuspensionspuffer	50 mM Tris/HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml Rnase A
Lysepuffer	200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS
Neutralisierungspuffer	3.0 M Kaliumacetat, pH5.5
Äquilibrationpuffer	750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15% (v/v) Isopropanol, 0.15% TritonX100
Waschpuffer	M NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15% (v/v) Isopropanol
Elutionspuffer	1.25 M NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 8.5, 15% (v/v) Isopropanol

Es werden 200 ml (Midi-Präparation) bzw. 500 ml (Maxi-Präparation) Antibiotika-haltiges LB-Medium mit den Bakterien angeimpft und über Nacht unter Schütteln (180 rpm) bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag werden die Bakterien 10 min bei 6.000 g und 4°C zentrifugiert und in 4 ml bzw. 10 ml Resuspensionspuffer aufgenommen. Die Bakteriensuspension wird vorsichtig bei RT mit 4 ml bzw. 10 ml Lysepuffer versetzt. Die Lysierung der Bakterien wird nach 5 min durch Zugabe von 4 ml bzw. 10 ml Neutralisierungspuffer abgebrochen. Nach weiteren 20 min Inkubation auf Eis werden die bakteriellen Bestandteile durch 30 minütige Zentrifugation bei 20.000 g. und 4°C abgetrennt. Der Überstand mit Plasmid-DNA wird über Filter auf eine mit 4 ml bzw. 10 ml Äquilibrationpuffer vorbehandelte Anionenaustauschersäule gegeben, die Plasmid-DNA bei bestimmter Salzkonzentration und pH-Wert binden kann. Zur Entfernung von RNA, Proteinen und niedermolekularen Verbindungen wird die Säule zweimal mit 10 ml bzw. 30 ml Waschpuffer gewaschen. Anschließend wird die gebundene Plasmid-DNA mit 5 ml bzw. 10 ml Elutionspuffer eluiert und in 3.5 ml bzw. 10.5 ml Isopropanol gefällt. Nach 30 minütiger Zentrifugation bei 15.000 g und 4°C wird die DNA mit 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach Trocknung wird die Plasmid-DNA in TE oder H<sub>2</sub>O aufgenommen.

**4.6.4. Agarose-Gelelektrophorese**

TAE-Puffer	40 mM Tris/Acetat, pH7.5, 20 mM NaOAc, 1 mM EDTA
5x Probenpuffer	15% Ficoll, 50 mM EDTA, 1x TAE, 0.05% Bromphenolblau, 0.05% Xylencyanol

Für ein 1%iges Gel wird 1 g Agarose in kochendem 100 ml TAE-Puffer gelöst, mit 1 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) versetzt. Nach dem Erstarren der Agarose wird diese in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer gesetzt. Die Proben werden mit dem 5 x Probenpuffer vermischt und auf das Gel geladen. Zur Abschätzung der Größe von DNA-Fragmenten wird neben dem Proben ein Größenmarker aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei ca. 100 V und 30 mA. Anschließend können die aufgetrennten DNA-Fragmente unter UV-Licht (360 nm) betrachtet werden. Zur präparativen Gewinnung von DNA-Fragmenten werden die Banden aus dem Gel geschnitten und unter Zuhilfenahme des QIAquick Kits isoliert.

#### **4.6.5. Isolierung von DNA aus Agarosegelen (QIAquick-Kit, Quiagen)**

Die zu isolierende DNA wird aus dem Agarose-Gel geschnitten. Das Gelstück wird unter Hochsalzbedingungen mit 300 µl Puffer QG bei 50°C für 10 min geschmolzen. Die Lösung wird auf eine Silica-Membran gegeben und bei 13.000 rpm für 1 min abzentrifugiert. Dabei bindet die DNA an die Säulenmatrix, während die Agarose-Salz-Lösung sedimentiert. Nach Waschen der Säule mit 700µl eines Ethanol-haltigen Puffers (Puffer PE) kann die DNA mittels H<sub>2</sub>O durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für 1 min eluiert werden.

#### **4.6.6. Fällung von DNA**

LiCl/Ethanol                      0.6 M LiCl in Ethanol (Lagerung bei -20°C)

Die DNA-haltige Lösung wird mit 2fachem Volumen LiCl/Ethanol-Lösung versetzt und für mindestens 10 min bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation (15 min; 13.000 rpm; 4°C) wird die DNA mit 70 %igem Ethanol entsalzt. Anschließend wird die Lösung zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet getrocknet.

### **4.7. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

#### **4.7.1.1. Photometrische Bestimmung**

Die Extinktion von Nukleinsäuren wird photometrisch bei 260 nm bestimmt. Eine Extinktion von 1 bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm entspricht annähernd 50 µg DNA bzw. 35 µg RNA in 1 ml Volumen. Hierbei ist die optische Dichte der DNA-Lösung abhängig vom

GC-Gehalt. Bei einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA mit einem 72%igen GC-Anteil beträgt die OD 1,04, während bei einem 30 %igen GC-Anteil die OD 0,94 beträgt. Das Verhältnis der bei 260 nm und 280 nm gemessenen Extinktionen sollte bei einer sorgfältig präparierten und proteinfreien Nukleinsäurelösung zwischen 1,8 (DNA) und 2,0 (RNA) liegen.

## **4.8. Modifizierung von DNA**

### **4.8.1. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen**

Die DNA wird mittels Restriktionsenzymen gespalten, wobei die vom Hersteller der Enzyme angegebenen Reaktionsbedingungen wie Puffer oder Temperatur beachtet werden. Die Reaktion kann durch Erhitzen für 20 min bei 65°C bis 80°C oder Phenolisierung abgestoppt werden.

### **4.8.2. Auffüllen von 5'-überstehenden Enden**

10x Klenow-Puffer	50 mM Tris/HCl in H <sub>2</sub> O, pH7.2, 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 0.1 mM DTT
dNTP-Mix	je 1 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP

Es werden maximal 1 µg DNA mit 5'-überstehenden Enden mit 3 µl des dNTP-Mixes und 1 U Klenow-Enzym in einem Gesamtvolumen von 50 µl bei 25°C für 30 min inkubiert. Die Reaktion wird durch Erhitzen auf 80°C für 20 min gestoppt.

### **4.8.3. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten**

10 x Phosphatase-Puffer	500 mM Tris/HCl, pH 9.0, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM ZnCl <sub>2</sub> , 1 mM Spermidin
-------------------------	---

Um bei ungerichteten Plasmid-Insert-Ligationen die Religation des Plasmids zu vermeiden, wurden die freien Enden des Plasmids mit alkalischer Phosphatase (calf intestine phosphatase = CIP) dephosphoryliert. Zur Dephosphorylierung überstehender 5'-Enden werden in einem Reaktionsansatz von 50 µl Endvolumen 5 µl 10 x Phosphatase-Puffer, 20 – 100 pmol Plasmid und 1 Unit alkalische Phosphatase 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 1 µl 125 mM EDTA, 1 % SDS gestoppt oder durch Inkubation bei 65°C für 10 min inaktiviert. Zur Dephosphorylierung gleich langer 5'- und 3'-Enden oder überstehender



3'-Enden wird der gleiche Reaktionsansatz erstellt. Der Ansatz wird aber 15 min bei 37°C und anschließend 15 min bei 56°C inkubiert. Nach einer nochmaligen Zugabe von 1 Unit alkalischer Phosphatase werden die Inkubationschritte wiederholt

#### 4.8.4. Ligation von DNA-Fragmenten

5x Ligase-Puffer                      250 mM Tris/HCl, pH7.6, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 25% (w/v) PEG8000,  
5 mM ATP, 5 mM DTT

Bei der Ligation verknüpft die T4-DNA-Ligase DNA-Fragmente, die sowohl kompatible, überstehende als auch glatte Enden besitzen. Dabei kommt es zu einer Phosphodiester-Bindung zwischen den 3'-OH- und den 5'-P-Enden der DNA.

Für die Ligation überstehender, kompatibler Enden werden in einem 10 µl Ansatz ca. 20 fmol eines zuvor gegebenenfalls dephosphorylierten Vektors mit ca. 60 fmol eines DNA-Fragments, 2 µl 5 x Ligase-Puffer und 2 U T4-DNA-Ligase eingesetzt. Inkubiert wird mindestens 4 Stunden bei Raumtemperatur oder bei 16°C über Nacht. Bei der Ligation mit synthetischen Oligonukleotiden wird mit der 1000fachen molaren Menge des Fragments ligiert.

#### 4.8.5. Gerichtete *in-vitro* Mutagenese

Die gerichtete *in-vitro* Mutagenese von Plasmiden wurde nach dem Protokoll des „QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Firma Stratagene durchgeführt. Für einen Standardreaktionsansatz mit einem Endvolumen von 50 µl wurden 50 ng Plasmid, je 125 ng der beiden Primer-Oligonukleotide, je 10 nmol der vier dNTPs, 5 µl 10 x Reaktionspuffer, 2,5 U *Pfu*-Turbo DNA-Polymerase und das erforderliche Volumen ddH<sub>2</sub>O gemischt. Nach einer Inkubation bei 95°C für 30 s durchlief der Reaktionsansatz 18 PCR-Zyklen, jeweils bestehend aus einer Denaturierungsphase von 30 sec bei 95°C, einer Hybridisierungsphase von 1 min bei 55°C und einer Synthesephase von 2 min/kb (300 s) des zu amplifizierenden Plasmids bei 68°C. Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf 4°C abgekühlt, mit 10 U *DpnI* versetzt und 1h bei 37°C inkubiert. Dadurch wurde die methylierte DNA des Ausgangsplasmids abgebaut. 1 µl des Reaktionsansatzes wurde direkt in kompetente Bakterien transformiert.

## 4.9. Charakterisierung von Nukleinsäuren

### 4.9.1. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein Verfahren zur Vermehrung bestimmter DNA-Sequenzen. Für dieses Verfahren muss ein Teil der zu amplifizierenden Sequenz bekannt sein, zu der komplementäre Oligonukleotid-Primer hergestellt werden können. Der Amplifikationsprozess besteht aus drei, sich wiederholenden Stufen. Zunächst wird die doppelsträngige DNA bei hoher Temperatur in zwei Einzelstränge zerlegt (Denaturierung). Anschließend binden bei niedriger Temperatur die Oligonukleotid-Primer an die komplementären Sequenzen (Annealing). Durch eine DNA-Polymerase werden die Primer verlängert (Primer-Extension). Danach kann der Zyklus von neuem beginnen. Aufgrund der hohen Temperaturen können nur thermostabile DNA-Polymerasen, wie die Taq-Polymerase verwendet werden. Es werden allerdings auch andere Enzyme verwendet, die eine „proof-reading“ Aktivität aufweisen, sodass im Verlauf des Extensionsprozess weniger Fehler auftreten.

#### Expand<sup>TM</sup> Long Template PCR (Roche Pharma):

10 x dNTP-Mix                      jeweils 25 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP

#### PCR-Ansatz:

100 pg / 100ng	Plasmid / HMW-DNA
5.0 µl	10 x PCR-Puffer
4.5 µl	10mM dNTP-Mix
1.0 µl	Primer A (100 pmol/µl)
1.0 µl	Primer B (100 pmol/µl)
1U	Polymerase in 1 x PCR-Puffer

mit H<sub>2</sub>O auf 50 µl Endvolumen auffüllen

#### PCR Programm:

4 min	Denaturierung bei 94°C	} 35x
1 min	Denaturierung bei 94°C	
1 min	Annealing bei optimaler Temperatur der Primer	
1 min/1000bp	Extension bei 68°C	
4 min	Finale Elongation bei 68°C	

BIO-X-ACT DNA Polymerase und BIO-Taq Polymerase (Bioline):

10 x dNTP-Mix                      jeweils 25 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP

## PCR-Ansatz:

100 pg / 100ng	Plasmid / HMW-DNA
5.0 µl	10 x PCR-Puffer
4.5 µl	10 mM dNTP-Mix
2.5 µl	50 mM MgCl <sub>2</sub>
1.0 µl	Primer A (100 pmol/µl)
1.0 µl	Primer B (100 pmol/µl)
1U	Polymerase in 1 x PCR-Puffer

mit H<sub>2</sub>O auf 50 µl Endvolumen auffüllen

## PCR Programm:

5 min	Denaturierung bei 95°C	
1 min	Annealing bei optimaler Temperatur der Primer	
1 min/1000bp	Extension bei 70°C	
30 sec	Denaturierung bei 95°C	} 30-35x
30 sec	Annealing bei optimaler Temperatur der Primer	
10 min	Finale Elongation bei 70°C	

**4.9.2. RT PCR**Superscript<sup>TM</sup> First-Strand Synthesis System für RT-PCR von Invitrogen

5 µg RNA werden mit 1 µl 10 mM dNTP-Mix und 1 µl Oligo dT Primer Mix vermischt und mit H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt. Zur Denaturierung von Sekundärstrukturen wird das RNA-Primer-Gemisch für 5 min bei 65 °C im Thermoblock vorinkubiert und anschließend 1 min auf Eis gestellt. Die Lösung der RT-Reaktion setzt sich aus 2 µl 10x RT Puffer, 4 µl 25mM MgCl<sub>2</sub>, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl des Rnase-Inhibitors Rnase Out zusammen und wird in einem PCR-Gefäß mit dem RNA-Primer Mix gemischt. Nach einer Inkubation von 2 min bei 42°C wird 1 µl Reverse Transkriptase hinzugefügt und die RT-Reaktion erfolgt bei 42°C für 50 min und bei 70°C für 15 min.

#### Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads von Amersham

5 µg RNA werden mit H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 32 µl aufgefüllt, für 10 min bei 65°C erhitzt und anschließend für mindestens 2 min auf Eis abgekühlt. Die RNA Lösung wird zu den First-Strand Beads gegeben ohne zu mischen. Nach 1 min wird 1 µl Oligo dT Primer hinzugegeben, vorsichtig gevortext und die Reaktion für 1h bei 37°C inkubiert.

#### **4.9.3. Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)**

Der Ansatz für die Real-Time PCR im LightCycler® Roche setzt sich zusammen aus 2 µl cDNA (20 – 200 ng), je 2 µl forward und reverse Primer (300 – 900 nM), 11 µl Sybr Green Mix und 5 µl H<sub>2</sub>O. Die PCR-Reaktion erfolgt in Glaskapillaren mit einem ersten Denaturierungsschritt von 5 min bei 95°C, gefolgt von 40-50 Amplifikationszyklen. Die Annealing Temperatur kann hierbei je nach Target variieren (58-62°C). Alle Proben werden in Duplikaten analysiert, als Negativ-Kontrolle wird eine Wasserprobe amplifiziert. Die Spezifität der amplifizierten PCR-Produkte wird durch Schmelzkurvenanalyse untersucht.

#### **4.9.4. Sequenzierung von DNA**

Die DNA-Sequenzierungen werden von der Arbeitsgruppe Genomanalyse des HZI durchgeführt. Pro Sequenzierungsreaktion werden 2 µl Plasmid (0,5 µg / µl) sowie je 10 µl Primer (1 pmol / µl) benötigt.

### **4.10. Gentransfermethoden**

#### **4.10.1. Transfektion mittels Calciumphosphat/DNA Präzipitation**

2 x HEBS-Puffer	280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1.5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> in H <sub>2</sub> O, pH 7.1
CaCl <sub>2</sub> -Lösung	2.5 M CaCl <sub>2</sub> in H <sub>2</sub> O

5 x 10<sup>5</sup> Zellen werden pro 9 cm<sup>2</sup> Platte einen Tag vor Transfektion ausgesät. Für die Transfektion wird in einem 5 ml Röhrchen 150 µl 2 x HEBS-Puffer vorgelegt. In einem zweiten Röhrchen werden 15 µl CaCl<sub>2</sub>, 5-10 µg DNA und H<sub>2</sub>O (Σ= 150 µl) vermischt. Anschließend wird das DNA-Gemisch unter vortexen zum HEBS-Puffer getropft. Dies wird für 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert bevor die Präzipitat-Suspension in das Kulturmedium gegeben wird. Nach 12-24 Stunden wird das Medium der Zellen gewechselt.

Für eine stabile Transfektion werden die Zellen nach zwei Tagen auf eine mittlere Platte transferiert und mit Selektionsmedium 14 Tage kultiviert.

#### **4.10.2. Transfektion mittels Metafectene**

Die Transfektion wird in Übereinstimmung mit den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt.  $0.8 - 1 \times 10^5$  Zellen werden pro 6 well ( $9 \text{ cm}^2$ ) ausplattiert und am nächsten Tag transfiziert. Hierzu werden 1-2  $\mu\text{g}$  DNA in 100  $\mu\text{l}$  serum- und antibiotikafreiem Medium aufgenommen, 10  $\mu\text{l}$  Metafectene-Reagenz werden ebenfalls in 100  $\mu\text{l}$  serum- und antibiotikafreiem Medium aufgenommen und die beiden Lösungen anschließend durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vereinigt. Nach einer Inkubation von 15-20 min wird die Lösung auf die Zellen gegeben und diese über Nacht im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Am folgenden Tag wird das Medium gewechselt.

#### **4.10.3. Retrovirale Infektion**

Für die retrovirale Infektion werden jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen pro  $9 \text{ cm}^2$  Platte ausgesät und am folgenden Tag mit viralen Partikeln infiziert. Die virushaltigen Zellkulturüberstände der Verpackungszellen werden mit einem  $0,45 \mu\text{m}$  Filter filtriert und Polybrene in einer Endkonzentration von  $8 \mu\text{g/ml}$  zugesetzt. Bei transienten Experimenten wurden die infizierten Zellen nach 12 – 16 Stunden Infektionszeit von den Kulturschalen abgelöst und in der gewünschten Zelldichte für weitere Versuche erneut ausgesät. Nach einer Kultivierungszeit von mindestens 24 – 48 Stunden erfolgte die Bestimmung der Infektionseffizienz am FACS.

Bei der Herstellung stabil exprimierender Zelllinien erfolgte nach 12 – 16 Stunden Infektionszeit ein Medienwechsel. Nach weiteren 24 Stunden in Kultur wurden die Zellen geerntet und am Zellsorter Fraktionen von infizierten und nicht infizierten Zellen gesammelt. Infizierte Zellen wurden in einer Konzentration von 100, 200, 500 und 1000 Zellen pro  $75 \text{ cm}^2$  Kulturschale ausgesät. Nach 7 bis 10 Tagen in Kultur wurden Einzelklone durch Abschaben unter dem Mikroskop selektiert, auf 96-Lochplatten ausgesät und weiterkultiviert.

#### **4.10.4. Durchführung einer Selektion**

Zwei Tage nach der Transfektion werden die Zellen mindestens eins zu drei umgesetzt und mit Selektionsmedium versetzt, das alle 2 – 3 Tage erneuert wird. Klone erscheinen je nach Selektion und Zelltyp 8 – 21 Tage später. Die Klone werden, wenn sie Stecknadelkopfgröße

erreicht haben, auf der Plattenrückseite mit Hilfe eines Filzstifts markiert, gezählt und die Zählung unter dem Mikroskop kontrolliert. Anschließend können Klone isoliert, als Mischung weiterverwendet oder subkloniert werden. Die zur Selektion verwendeten Drogenkonzentrationen sind vom Zelltyp abhängig und müssen vorher ausgetestet werden.

## **4.11. Durchflusszytofluorimetrie (FACS)**

### **4.11.1. Bestimmung der Infektionseffizienz**

FACS-Puffer: 2% (v/v) FCS in PBS

Wird in Zellen neue DNA eingebracht, so tragen die dabei verwendeten Plasmide bzw. Lentiviren häufig zusätzliche Gene, die für Fluorochrome codieren. Zellen die erfolgreich Plasmid-DNA aufgenommen haben bzw. infiziert wurden, exprimieren so neben dem Transgen auch das Fluorochrom. Im FACS kann nun die Menge an fluoreszierenden Zellen gemessen oder Fraktionen verschieden stark transgenexprimierender Zellen gesammelt werden. Die Zellen wurden auf der Gewebekulturschale einmal mit PBS gewaschen, mit 1 x TEP von den Kulturschalen abgelöst und in 2 ml FACS-Puffer aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 300 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 300 bis 500 µl FACS-Puffer resuspendiert. Um tote Zellen und lebenden Zellen unterscheiden zu können, wurden zum FACS-Puffer 0.5 µg/ml Propidiumjodid zugegeben.

### **4.11.2. Zellzyklusanalyse**

FACS-Puffer: 2% (v/v) FCS in PBS

Die zu analysierenden Zellen wurden in PBS gewaschen, mit 1x TEP von der Kulturschale abgelöst und in 2 ml FACS-Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden für 5 min bei 300 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml 80%igen Methanol (20°C) unter kontinuierlichen schütteln (vortexen) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zur Fixierung über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde 5 ml 0.1% (w/v) Saponin in PBS zu den Zellen gegeben, der Ansatz gevortext und für 5 min bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und der Waschschrift wiederholt. Anschließend erfolgte die Färbung der Zellen mit 1 mg/ml Rnase S, 20 µg/ml Propidiumjodid und 0.1% (w/v) Saponin in PBS. 125 µl dieser Färbelösung wurde auf das Zellpellet pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 bis 45

min bei Dunkelheit wurde das Zellpellet weitere zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und anschließend am FACS vermessen. Die Anregungswellenlänge betrug 488 nm. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm ModFit.

#### **4.11.3. BrdU-Färbung**

Die BrdU Färbung erlaubt den Anteil der replizierenden Zellen zu bestimmen, da dieses Thymidinanalogon nur während der Synthesephase in die DNA eingebaut wird. Zunächst müssen die Zellen ( $1.25 \times 10^5$  Zellen auf  $75 \text{ cm}^2$ ) für einen bestimmten Zeitraum mit BrdU ( $10 \mu\text{M}$ ; Sigma) inkubiert werden. Zur anschließenden Detektion werden die Zellen typsinisiert und mit kalten PBS ( $4^\circ\text{C}$ ) gewaschen bevor dem Zellpellet 2ml  $-20^\circ\text{C}$  kalter Etanol unter vortexen dazugetropt wird. Die Zellen müssen mindestens für 4 h, besser über Nacht fixiert werden. Als nächstes muss die DNA denaturiert werden, um das eingebaute BrdU für die Antikörper zugänglich zu machen. Dazu wird die Zellsuspension für 10 min bei 1500 rpm zentrifugiert, das Zellpellet in 1ml 2 N HCl resuspendiert und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die Zellen für 10 min bei 1500 rpm zentrifugiert, mit 1ml  $0.1 \text{ M Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  pH 8.5 neutralisiert und für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Anschließend wird  $1 \mu\text{g/ml}$  eines anti BrdU Antikörpers in  $100 \mu\text{l}$  PBS mit  $0.1\%$  Sapronin für 30 min zu den Zellen gegeben. Danach werden die Zellen 3 x mit PBS/ $0.1\%$  Sapronin gewaschen und in  $500 \mu\text{l}$  PBS/ $0.1\%$  Sapronin mit  $20 \mu\text{g/ml}$  PI,  $1 \text{ mg/ml}$  Rnase und  $1 \mu\text{g/ml}$  des sekundären Antikörpers inkubiert. Die Zellen werden nochmal in PBS/ $0.1\%$  Sapronin gewaschen, bevor die Analyse mit dem FACS stattfinden kann.

### **4.12. Proteinanalytik**

#### **4.12.1. Zellaufschluss**

Lysepuffer:  $9930 \mu\text{l}$   $250 \text{ mM}$  Tris HCl, pH 7.5,  $50 \mu\text{l}$  Triton pure,  $2 \mu\text{l}$   $0.1 \text{ M}$  PMSF (Proteinase-Inhibitor)

Zellen einer mittleren Platte ( $75 \text{ cm}^2$ ) werden mit PBS gewaschen, abgeschabt und das Pellet bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert oder sofort zu Zellextrakten weiterverarbeitet. Hierzu wird das Pellet in  $50 \mu\text{l}$  Lysepuffer aufgenommen, durch vortexen gelöst und 10 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation von  $10.000 \text{ rpm}$  für 10 min bei  $4^\circ\text{C}$  wird der Überstand vorsichtig abgenommen und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

#### 4.12.2. Proteinbestimmung (BCA-Assay)

Lösung A	1 g BCA (Bicinchoninsäure), 160 mM $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times \text{H}_2\text{O}$ (2 g), 7 mM $\text{Na}_2$ -Tartrat (1,6 g), 110 mM $\text{NaHCO}_3$ (0,95 g), 1 N NaOH, pH 11.25, ad 100ml $\text{H}_2\text{O}$
Lösung B	$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ (4 g), ad 100 ml $\text{H}_2\text{O}$
Gebrauchslösung	15 ml Lösung A + 0.3 ml Lösung B
Lysozym-Stocklösung	3 mg / ml

In einer Mikrotiterplatte für optische Tests (96 Löcher a  $0.32 \text{ cm}^2$ ) werden in die Löcher der ersten Reihe 190  $\mu\text{l}$ , in die anderen Reihen jeweils 100  $\mu\text{l}$  Gebrauchslösung vorgelegt. 10  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  als Blank-Wert, sowie der Standardproteinlösung (3 mg/ml Lysozym) bzw. der zu messenden Proteinextrakte werden in die Löcher der ersten Reihe pipettiert. Mit einer Multikanalpipette wird gut durchmischt, 100  $\mu\text{l}$  entnommen und in die zweite Reihe gegeben. So fährt man fort und erhält jeweils eine 1:2-Verdünnung. Nach einer Inkubationszeit von 10 bis 30 min bei  $50^\circ\text{C}$  im Brutschrank kann die Mikrotiterplatte im ELISA-Reader bei 562 nm gemessen werden. Anhand der Standardwerte der Lysozymlösung können die Proteingehalte der Proben berechnet werden.

#### 4.12.3. Polyacrylamid Gelelektrophorese

##### Tricine-Gele

Kathodenpuffer:	20 mM Tris/HCl (pH 8.25), 20 mM Tricine, 0.02 % SDS
Anodenpuffer:	40 mM Tris/HCl (pH 8.9)
Gelpuffer:	3 M Tris/HCl (pH 8.45), 0.3 % SDS
Auftragspuffer:	50 mM Tris/HCl (pH 6.8), 4 % SDS, 12 % Glycerol, 2 % $\beta$ -Mercaptoethanol, 0.01 % Serva-Blue

Ein 10 %iges Trenngel wird aus 7,1 ml Acrylamid/Bis-Acrylamid (49,5/1,5), 2 ml Glycerin, 5 ml Gelpuffer und 0.9 ml  $\text{H}_2\text{O}$  angesetzt. Zur Polymerisierung werden 15  $\mu\text{l}$  TEMED und 150  $\mu\text{l}$  10 %iges APS zugesetzt und die Lösung zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisierung wird das Isopropanol entfernt, das Sammelgel in den verbleibenden Raum gegossen und der Kamm zur Taschenbildung eingesetzt. Das Sammelgel setzt sich zusammen aus 1.2 ml Acrylamid/Bis-Acrylamid (49,5/1,5), 1.5 ml Gelpuffer, 3.5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  und 10  $\mu\text{l}$  TEMED sowie 100  $\mu\text{l}$  10 %iges



APS zur Polymerisation. Das Gel wird nach dem Auspolymerisieren in die Elektrophoresekammer eingesetzt und der Anoden- bzw. Kathodenpuffer eingefüllt. Die Proben werden im Auftragspuffer für 5 min bei 65°C denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese läuft über Nacht bei 30 V oder bei 120 V für 3 – 4 Stunden.

#### Bis-Tris-Gele

MES-SDS (20 x) :                      1 M MES ; 1 M Tris ; 69.5 mM SDS ; 20.5 mM EDTA ; pH 7.3

Um Proteine mit stark abweichenden Größen auf einem Western Blot zu detektieren können Gradientengele, wie die NuPAGE® Bis-Tris-Gele (4-12%) von Invitrogen, verwendet werden. Das Gel wird in die Invitrogen-Elektrophoresekammer eingesetzt und der 1x MES-SDS Puffer eingefüllt. Die Proben werden für 5 min im 4x NuPAGE Sample Reducing Agent (Invitrogen) bei 65°C erhitzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese läuft bei 150 V für 1 – 2 Stunden.

#### Nicht-denaturierende Polyacrylamidgele

10x TBE (1l)                              100 g Tris/Base; 55.6 g Borsäure; 9.3 g EDTA

Die Rezeptur für zwei 8%ige EMSA-Standardgele setzt sich folgendermaßen zusammen: 13.3 ml Polyacrylamid (30 %), 2.5 ml 10 x TBE, 34.2 ml H<sub>2</sub>O, 500 µl 10% APS und 100 µl TEMED.

#### **4.12.4. Western Blot**

Nach der Auftrennung in einem Gelsystem werden die Proteine im elektrischen Feld auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Nach Absättigung aller freien Bindungsstellen durch Fremdproteine (z.B. BSA oder FCS) erfolgt der Nachweis eines bestimmten Proteins über die spezifische Interaktion mit einem Antikörper.

#### Semi-Dry-Blot

Blotpuffer:                              25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycin, 15% (v/v) Methanol

TBS-T:                                    20 mM Tris/HCl pH 7.5, 137 mM NaCl, 0.1% Tween-20

Nach der Elektrophorese werden das Gel und die Wine Hybond ECL-Membran (Amersham) 10 min in Blotpuffer äquilibriert und 6 Whatman-3MM-Filterpapiere in der Größe eines Gels in Blotpuffer angefeuchtet. In der Semidry-Elektroblot-Apparatur wird die Membran auf drei Lagen Whatman-Papier und das Gel luftblasenfrei auf die Membran gelegt und mit drei Lagen Whatman-Papier bedeckt. Der Transfer der Proteine erfolgt in 30 min bei 10 V.

## Nass-Blot

Transferpuffer	50 mM Tris; 39 mM Glycin; 1.3 mM SDS; 20% (v/v) Methanol
----------------	--

Vor dem Transfer werden die Membran, 4 Whatman-3MM-Filterpapiere und die zur Apparatur gehörigen Schwämme in methanolhaltigem Transferpuffer äquilibriert. Auf die Kathode der Nass-Elektroblot-Apparatur wurden nun in der angegebenen Reihenfolge geschichtet: 3 Schwämme, zwei Lagen Whatman 3MM-Papier, das Trenngel, die Membran, zwei weitere Lagen Whatman 3MM-Papier, 3 Schwämme und die Anode. Der Transfer erfolgt für 70 min bei 30 V.

Für den immunologischen Nachweis von gebundenen Proteinen wird die Membran mit 10% FCS oder 3% BSA in TBS-T 2 h bei Raumtemperatur (RT) oder über Nacht bei 4°C abgesättigt. Die Inkubation mit dem primären, Protein-spezifischen Antikörper erfolgt für mindestens 1 h bei RT. Die Lösung, Konzentration und Dauer der Inkubation muss für jeden Antikörper individuell bestimmt werden. Nach 3-maligem 10 minütigem Waschen mit TBS-T/10% FCS wird mit dem sekundären, Antikörper-spezifischen Antikörper (z.B. Ziege anti-Maus-IgG gekoppelt mit alkalischer Phosphatase, Dianova) für mind. 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem 3-maligem Waschen werden die Antigen-Antikörper-Komplexe auf der Membran mit Hilfe der "Enhanced Chemilumineszenz" (ECL, Amersham, für Peroxidase) nachgewiesen. Dazu wird je 1 Volumen der beiden ECL-Lösungen miteinander vermischt und die Membran 1 min darin inkubiert. Dabei entstehen durch die Oxidation von Luminol Lichtblitze, die durch Exposition eines Films (Hyperfilm ECL, Amersham) sichtbar gemacht werden können. Nach dem Nachweis eines Proteins kann die Membran einige Male gestrippt werden, um weitere Proteine nachzuweisen (u.a.  $\beta$ -Actin als Abgleich). Die Membran wird in Re-Blot Plus mild (1:10 in H<sub>2</sub>O) für 20 min bei RT auf einem Schüttler inkubiert und anschließend 2 x für 15 min in TBS-T mit 10% FCS geblockt. Jetzt kann die nächste Inkubation eines Primärantikörpers erfolgen.

#### 4.12.5. Immunpräzipitation

RIPA-Puffer	20 mM Tris-HCl (pH 7.5); 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% (v/v) Triton X-100; 0.5% (w/v) Na-Deoxycholat; 0.1% (w/v) SDS; 50 mM NaF; 2 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> ; 5 µM ALLN; 40 µM MG-132; 1/50 Volumen Protease Inhibitor Cocktail Set III in dd H <sub>2</sub> O
IP-Puffer	20 mM Tris-HCl (pH 7.5); 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 5% (v/v) Glycerin; 0.5% (v/v) Tween-20; 50 mM NaF; 2 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> ; 5 µM ALLN; 40 µM MG-132; 1/50 Volumen Protease Inhibitor Cocktail Set III in ddH <sub>2</sub> O

Präzipitationen mit spezifischen Antikörpern wurden durchgeführt, um ein bestimmtes Protein aus dem Proteingemisch eines Zellextraktes abzutrennen. Alle Schritte wurden bei 4°C oder auf Eis unter Verwendung vorgekühlter Lösungen durchgeführt. Nach Ernte der induzierten Zellen erfolgte ihre Lyse durch Zugabe von 150 µl RIPA-Puffer zu den Zellpellets. Die Zellen wurden gründlich gevortext und für 30 – 60 min auf einem Drehrad bei 4°C inkubiert. Die Zelltrümmer wurden durch eine 20-minütige Zentrifugation (12.000 g, 4°C) sedimentiert und die proteinhaltigen Überstände in frische Eppendorfgefäße überführt. Daran anschließend erfolgte die Konzentrationsbestimmung der Proteine im BCA-Assay.

Je nach Versuchsansatz wurden zwischen 500 und 1000 µg Protein in frische Eppendorfgefäße vorgelegt und mit IP-Puffer auf ein Endvolumen von 500 µl aufgefüllt. Abschließend erfolgte die Zugabe von 30 µl Protein A/G PLUS-Agarose (Santa Cruz) sowie 1 µg des spezifischen Antikörpers, gegen das zu präzipitierende Protein. Die Ansätze wurden zur Präzipitation über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Sodann wurden die Ansätze dreimal mit jeweils 50 µl frisch hergestellten RIPA-Puffer gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurden die Agarosekügelchen durch Zentrifugation bei 350 g sedimentiert. Nach der letzten Wäsche wurde der RIPA-Puffer komplett abgesaugt, je 9 µl 4 x NuPAGE Sample Reducing Agent und 1 µl 10 x NuPAGE LDS Sample Buffer zugegeben und die Proben 5 min bei 95°C denaturiert. Die denaturierten Proteinextrakte wurden auf Eis abgekühlt und anschließend in die Taschen eines SDS-Gels geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 10 bis 20 V/cm. Nach der Elektrophorese wurde das Trenngel zwischen den Glasplatten entfernt und die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert.

**4.12.6. Kinaseaktivitätstests für CDK2 und CDK4 (Wolf et al., 2003, modifiziert)**CDK2

Lysispuffer (100 ml): 15 ml 1M NaCl, 5 ml 1M Tris HCl pH 7.4, 1 ml 0.5 M EDTA, 5 ml 10% Natriumdeoxycolate, 1 ml NP-40, 100 µl 1 M NaVO<sub>4</sub>, 100 µl 1 M NaF, 100 µl 1 M DTT, 574 µl 0.1 M PMSF, 3.87 µl Proteaseinhibitor SetIII (Calbiochem)

Kinasepuffer ohne  $\gamma^{32}$  [P] ATP und ohne Substrat (50 ml):  
2.5 ml 1 M Tris HCl pH 7.4, 3.5 ml 1 M NaCl 500µl 1M MgCl<sub>2</sub>,  
50µl 1 M DTT

Kinasepuffer mit  $\gamma^{32}$  [P] ATP und mit Substrat (250 µl):  
239 µl Kinasepuffer ohne ATP und ohne Substrat, 5 µl Histone H1.2 (10 µg/µl; Calbiochem), 1 µl 25 mM ATP, 5 µl  $\gamma^{32}$  [P]ATP

CDK4

Lysispuffer (100 ml): 15 ml 1 M NaCl, 1 ml 1 M β-Glycerophosphate, 500 µl 0.5 M GTA, 200 µl 0.5 M EDTA, 10 ml Glycerol, 100 µl Tween 20, 10 µl 1 M NaVO<sub>4</sub>, 100 µl 1 M NaF, 100 µl 1 M DTT, 574 µl 0.1 M PMSF, 3.87 µl Proteaseinhibitor SetIII (Calbiochem)

Kinasepuffer ohne  $\gamma^{32}$  [P] ATP und ohne Substrat (50 ml):  
2.5 ml 1 M HEPES pH 7.4, 500 µl 1 M MgCl<sub>2</sub>, 500 µl 1 M β-Glycerophosphate, 500 µl 0.5 M EGTA, 5 µl 1 M NaVO<sub>4</sub>, 50 µl 1 M NaF, 50 µl 1 M DTT

Kinasepuffer mit  $\gamma^{32}$  [P] ATP und mit Substrat (200 µl):  
192.4 µl Kinasepuffer ohne ATP und ohne Substrat, 2 µl Rb (769) Santa Cruz (1 µg/µl), 1.6 µl 2.5 mM ATP, 4 µl  $\gamma^{32}$  [P]ATP

Die Bestimmung der Aktivität einer Kinase erfolgt meistens mit Hilfe von künstlichen Substraten und in Anwesenheit von radioaktivem ATP. Ist die Kinase aktiv, wird das radioaktive Phosphat des ATPs auf das Substrat übertragen. Die anschließende Detektion der radioaktiven Substrate ist ein sehr sensitives Verfahren indem auch kleinste Mengen nachgewiesen werden. Alle Schritte wurden bei 4°C oder auf Eis unter Verwendung vorgekühlter Lösungen durchgeführt. Die Zellen wurden in 1ml Lysispuffer von der Platte geschabt und für 60 min auf einem Drehrad bei 4°C invertiert. Die Zelltrümmer wurden durch eine 20 minütige Zentrifugation (10.000 rpm, 4°C) sedimentiert und die Proteinkonzentration

der Überstände im BCA-Assay (siehe Kapitel 4.12.2.) bestimmt. Danach werden 500 µg Proteinextrakt mit 1 µg des CDK2 bzw. CDK4 spezifischen Antikörpers über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad invertiert. Am nächsten Tag werden 30 µl Protein A/G PLUS-Agarose (Santa Cruz) zu dem Ansatz gegeben und für 1 h bei 4°C invertiert. Die Agarose wird 4 x mit Lysispuffer und 3 x mit Kinasepuffer ohne  $\gamma^{32}$  [P] ATP und ohne Substrat gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurden die Agarose durch eine 5 minütige Zentrifugation bei 2500 rpm (4°C) sedimentiert. Für die Kinasereaktion wird die Agarose mit 25 µl Kinasepuffer mit  $\gamma^{32}$  [P] ATP und mit Substrat für 30 min bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Reaktion wird mit 8 µl 4 x NuPAGE Sample Reducing Agent abgestoppt und die Proben werden für 3 min bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgt für 1.5 h bei 150 V auf 4-12% Bis-Tris Gelen von Invitrogen. Die Banden der radioaktiv markierten Substrate werden mit Hilfe eines PhosphorImager detektiert.

#### **4.12.7. *In vitro* – Translation mit Retikulozyten-Lysat aus Kaninchen**

Die *in vitro*-Translation von *in vitro* transkribierter RNA lässt sich in Retikulozyten-Lysat aus Kaninchen (RRL) durchführen. Dieses Lysat ist in verschiedenen Ausführungen im Handel erhältlich. Es gibt komplette Systeme und welche, bei denen alle oder eine bestimmte Aminosäuren depletiert ist. Soll ein neu translatiertes Protein direkt und ohne weitere Anfärbung in SDS-Proteingelen sichtbar gemacht werden, kann radioaktiv markiertes Methionin oder Leuzin zum Reaktionsansatz gegeben werden, was in die neu synthetisierten Proteine eingebaut wird.

Ein gekoppeltes Transkriptions-/Translationssystem (TNT<sup>®</sup> Quick Coupled Transcription/Translation Systems) wird von der Firma Promega angeboten. Bei diesem System ist besonders darauf zu achten, dass die transkriptionelle Regulation des Gens durch einen für die jeweilige RNA-Polymerase geeigneten Promotor erfolgt. Ein Translationsansatz zur Herstellung von nicht radioaktiv markiertem Proteinen setzt sich wie folgt zusammen: 40 µl TNT<sup>®</sup> Quick Master Mix, 1 µl 1 mM Methionin, 2 µl DNA-Template (0.5 µg/µl) und 7 µl ddH<sub>2</sub>O. Die Inkubation findet für 60 min bei 30°C statt. Im Anschluss werden 5 – 10 µl Aliquots bei -20°C eingefroren.

**4.12.8. „Electrophoretic mobility shift assay” (EMSA)**

10 x Polynukleotid-Kinase-Puffer:	50 mM Tris/HCl (pH 7.6); 0.1 M MgCl <sub>2</sub> ; 10 mM EDTA; 50 mM DTT
5 x Bindungspuffer:	50 mM HEPES pH 8.0; 25 mM MgCl <sub>2</sub> ; 250 mM KCl; 10% Ficoll (w/v), 0.025% Bromphenolblau (w/v); 0.025% Xylencyanol (w/v)

Der EMSA, auch Gel-Shift Assay genannt, ist eine schnelle und sehr sensitive Methode zur Untersuchung von Nukleinsäure-Protein Interaktionen. Das System basiert auf der Beobachtung, dass Proteinbindung an DNA- oder RNA-Fragmente zu einer verminderten elektrophoretischen Mobilität dieser Fragmente in einem nichtdenaturierenden Polyacrylamidgel führt. EMSA-Gele sind in der Regel zwischen 4-8%ig (siehe Kapitel 4.12.3). Generell gilt, je höher die Acrylamidkonzentration des Gels, desto schärfer die „Shifts“ der entsprechenden Komplexe. Die hohe Sensitivität des EMSAs liegt in der Verwendung von radioaktiv markierten DNA-Sonden, die es erst ermöglichen DNA-Bindung gering exprimierter Proteine, wie die meisten Transkriptionsfaktoren, nachzuweisen. Hierzu wird 1 pmol Oligonukleotid-DNA mit 1 µl 10 x Kinase-Puffer, 1-2 µl  $\gamma$  <sup>32</sup> [P] dATP (3000 Ci/mmol) und 1 µl T4-Polynukleotid-Kinase (10 U) versetzt. Die Reaktion wird in einem Gesamtvolumen von 10 µl durchgeführt. Nach 30 min Inkubation wird die Reaktion durch eine 5 minütige Erwärmung auf 65°C gestoppt. Anschließend können nicht inkorporierte Nukleotide und Salze über MicroSpin G-50 Säulen (Amersham) vom Kinasierungsansatz abgetrennt werden. Um doppelstrangbindende Proteine untersuchen zu können, müssen die komplementären, radioaktiv markierten Oligonukleotide vor dem Start des Experiments annealed werden. Dazu vereinigt man äquimolare Mengen der komplementären Oligonukleotide, kocht diese 5 min bei 95°C auf, bevor sie für einen Zeitraum von etwa 2 h im Thermoblock bis auf RT abgekühlt werden. Die eigentliche Bindungsreaktion setzt sich standardmäßig wie folgt zusammen: 5 µl in vitro translatiertes Protein (siehe Kapitel 4.12.7.), 5 µl 5 x Bindungspuffer, 1 µg polyIC (1000-fach molarer Überschuss), 200fach molarer Überschuss an unspezifischem Einzelstrangkompetitor und etwa 50 fmol DNA-Sonde. Für die Supershift Versuchen wird dem Ansatz 0.5 µg eines spezifischen Antikörpers zugesetzt. Der Gesamtreaktionsansatz mit einem Endvolumen von 25 µl wird für 30 min bei 37°C inkubiert.

Das Gel wird vor dem Auftragen der Proben für etwa 30 – 45 min bei 60 – 70 V einem Vorlauf unterzogen. 0.25% TBE dient als Laufpuffer. Der eigentliche Gellauf variiert je nach Sondenlänge und Prozentigkeit des Gels und beträgt beispielsweise für 50-mer Sonden in

einem 8 %igem Gel etwa 4 h bei konstanten 140 V. Anschließend wird das Gel auf 2 Lagen 3MM Whatmann-Filterpapier transferiert, mit Frischhaltefolie blasenfrei abgedeckt und 30 min bei 60°C auf einem Gelrockner getrocknet. Zuletzt wird das Gel in eine Expositionskassette überführt und je nach Stärke der Sonden für mehrere Stunden oder Tage exponiert. Das Autoradiogramm wird mithilfe eines PhosphoImager eingescannt.

#### **4.12.9. Bestimmung der Luciferase-Aktivität**

Die Luciferase-Aktivität wurde mittels des Dual-Luciferase-Assay Kits (Dual Luciferase Reporter Assay System, Promega) entsprechend den Angaben des Herstellers bestimmt. Hierzu wurden Zellen mit einem Reporterkonstrukt transient transfiziert. Dieses besteht aus dem Firefly-Luciferase-Gen, dessen Transkription durch den zu untersuchenden Promotor reguliert wird. Zum Transfektionsabgleich wird ein Vektor mit dem Renilla-Luciferase-Gen unter einem konstitutiven Promotor kotransfiziert.

#### **4.12.10. In-vitro Imaging von endogenem p27 mittels Immunfluoreszenz**

Die Zellen wurden in einer Dichte von  $2 \times 10^4$  Zellen/Loch einer 12-Lochplatte auf sterilen Deckgläschen ausgesät. Es erfolgte zeitabhängig die Induktion der Zellen mit Doxzyklin bzw. Östrogen. Vor dem Fixieren der Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Zu den Zellen wurde je 1 ml 4%iges (w/v) Paraformaldehyd gegeben. Daran schloss sich eine 30 minütige Inkubation bei Raumtemperatur an. Nach der Fixierung wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellmembran erfolgte eine Inkubation der Zellen in 1 ml 0.2% (v/v) Triton X-100 in PBS für 15 – 20 min bei RT. Das Detergenz wurde durch dreimaliges waschen der Zellen für 30 min mit 10% (v/v) FCS + 0.1% (v/v) Tween-20 in PBS entfernt, wobei das FCS zur Absättigung (Blocken) unspezifischer Bindestellen diente. Der Primärantikörper Kaninchen-anti-p27 (N-20) von Santa Cruz wurde 1:50 in 10% (v/v) FCS + 0.1% (v/v) Tween-20 in PBS verdünnt. Jeweils 350 µl dieser Verdünnung wurden auf die Zellen pipettiert. Dann wurden die Zellen über Nacht bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend wurde der ungebundene Primärantikörper durch dreimaliges waschen der Zellen für 30 min mit 10% (v/v) FCS + 0.1% (v/v) Tween-20 in PBS entfernt. Der sekundäre Antikörper Ziege-anti-Kaninchen-Cy3 von Dianova wurde 1:800 in 10% (v/v) FCS + 0.1% (v/v) Tween-20 in PBS verdünnt. Jeweils 350 µl dieser Verdünnung wurde auf die Zellen gegeben, die dann bei RT für 2 – 3 Stunden inkubiert wurden. Abschließend wurde nicht gebundener Antikörper durch dreimaliges waschen der Zellen für 30 min mit

10% (v/v) FCS + 0.1% (v/v) Tween-20 in PBS entfernt. Vor dem Einbetten der Zellen in Mowiol wurden die Deckgläschen einmal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen, um verbliebene Detergenzreste zu entfernen. Nach dem Aushärten des Mowioms (über Nacht) konnten die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht werden.

#### **4.12.11. Bestimmung von Interferon**

Interferon verleiht Säugerzellen homologer Spezies antiviralen Schutz. Die Bestimmung von murinem Interferon erfolgt in LMTK<sup>-</sup> Zellen. Die Zellen werden auf Mikrotiterplatten in DME-Medium in einer Konzentration  $3 \times 10^6$  Zellen/96-Loch-Platte ausgesät, so dass die Platten am nächsten Tag konfluent bewachsen sind. Vor Zugabe der Zellüberstände wird das alte Medium abgeschlagen und pro Loch 100 µl frisches Medium auf die Zellen gegeben. 100 µl der zu testenden Überstände bzw. 100 µl Interferonstandard (1000 IE) werden in die Löcher der ersten Reihe pipettiert. Mit einer Multikanalpipette wird gut durchmischt, 100 µl entnommen und in die zweite Reihe gegeben. So fährt man fort und erhält jeweils eine 1:2 Verdünnung. Die Zellen werden für 24 h inkubiert, das Medium abgeschlagen und je 100 µl einer Virussuspension (VSV 1:10000 verdünnt in DME mit 5 % FCS und) pro Loch der Mikrotiterplatte auf die Zellen gegeben. 48 h nach der Infektion der LMTK<sup>-</sup> Zellen kann die Lyse der nicht oder ungenügend geschützten Zellen im Mikroskop beobachtet werden. Durch visuellen Vergleich mit dem Interferonstandard kann anhand des antiviralen Schutzes der Zellen der Interferongehalt in den einzelnen Proben ermittelt werden.

### **4.13. Genexpressionsanalyse**

#### **4.13.1. Synthese der markierten RNA**

Die Qualität und Integrität der RNA wird mit dem Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies; Waldbronn, Germany) überprüft. Zunächst wird die Gesamt RNA in cDNA umgeschrieben, wozu 50 -100 ng RNA benutzt werden. Diese werden einer reversen Transkription unterzogen. 100 pmol des T7-(T)<sub>24</sub> werden zu der RNA gegeben und erhitzt (10 min, 70°C). Anschließend werden 4 µl „First strand“ Puffer, 2 µl 0.1 mM DTT und 1 µl 10 mM dNTPs hinzugefügt und erhitzt (42°C, 2 min) bevor die reverse Transkription durch Zugabe von 1 µl (200 U) SSII Reverse Transkriptase (Invitrogen) gestartet wird (42°C, 1 h). Dann werden 91 µl DEPC H<sub>2</sub>O, 30 µl „Second strand“ Puffer, 4 µl (40 U) DNA Polymerase I, 3 µl 10 mM dNTPs, 1 µl (10 U) DNA Ligase und 1 µl (2 U) Rnase H hinzugegeben, um



doppelsträngige DNA zu generieren (16°C, 2 h). Zuletzt werden 2 µl (20 U) T4 DNA Polymerase hinzugegeben und für 10 min bei 16°C inkubiert. Die Reaktion wird durch EDTA abgestoppt und die cDNA wird präzipitiert.

Von der cDNA werden 10 µl zusammen 4µl Hybridisierungspuffer, 4 µl Biotin markierter Ribonukleotide, 4 µl 10 x DTT, 2 µl 20 x T7 RNA Polymerase, 12 µl H<sub>2</sub>O bei 37°C für 5 h für die in vitro Transkription inkubiert.

#### **4.13.2. Hybridisierung der cRNA mit den „DNA-Microarray-Chips“**

10 µg der Biotin markierten cRNA werden zusammen mit 13 µl Kontrolloligos bakteriellen und eukaryontischen Ursprungs, 2 µl BSA (acetyliert); 100 µl 2 x Hybridisierungspuffer (100 mM MES, 1 M [Na<sup>+</sup>], 20 mM EDTA, 0.01 % Tween) und 2 µl Heringssperma-DNA (10 mg/ml) für 16 h bei 45°C unter ständigem Schütteln (60 rpm) mit den „DNA-Microarray-Chip“ (MG-U74A) inkubiert. Anschließend werden die „DNA-Microarray-Chips“ gewaschen (10 Zyklen bei 25°C mit Waschpuffer A; 4 Zyklen bei 50°C mit Waschpuffer B) und mit Phycoerythrin markierten Streptavidin gefärbt (30 min, 25°C). Nachfolgend findet ein letzter Waschriff mit Waschpuffer A bei 25°C (10 Zyklen) statt. Alle Reaktionsschritte von Hybridisierung, Waschen, Färben und Scannen der „DNA-Microarray-Chips“ wird mit Hilfe der „Affymetrix GeneChip fluidic station“ durchgeführt.

#### **4.13.3. Datenanalyse der „DNA-Microarrays“**

Die Fluoreszenzsignale der „DNA-Microarray-Chips“ wurden mit Hilfe der Software „Affymetrix Microarray Suite 5.0“ ausgewertet. „Affymetrix MicroDB 3.0“ und „Affymetrix Data Mining Tool 3.0“ wurden verwandt, um die Daten in ein für das Datenbankprogramm Microsoft Access lesbares Format zu bringen.

Mit Hilfe von Microsoft Access wurden die differentiell regulierten Gene ermittelt. Dabei wurden folgende Abfragekriterien verwendet: (1) ein Gen musste in einem Vergleich wenigstens 1.5 bzw. 3.0fach hoch- oder runterreguliert sein, (2) das Gen musste mindestens in einem der beiden Proben ein Fluoreszenzsignal von 50 aufweisen, (3) das Gen musste einen „change p-value von 0.05 (hochregulierte Gene) beziehungsweise 0.95 (herunterregulierte Gene) aufweisen.

#### 4.13.4. „Gene Ontology“ Analyse

Für die „Gene Ontology“-Analyse wurde das freierhältliche Programm GOSurfer (Zhong et al., 2004) verwendet. Dieses nutzt die Annotationen, welche von der Firma Affymetrix für ihre „DNA-Microarray-Chips“ bereitgestellt werden. Um eine Liste von Genen zu analysieren, muss davon nur eine .txt-Datei generiert und in GOSurfer importiert werden. Gene deren Transkription durch die Onkogene c-myc und c-H-ras dereguliert und durch IRF-1 normalisiert wird (Kapitel 2.1.2 und 2.1.3) wurden einer solchen Analyse unterzogen. Dazu wurden jeweils die durch IRF-1 induzierten und die reprimierten Gene gruppiert. Anschließend wurden die beiden Gruppen mit Hilfe von GOSurfer untereinander verglichen. Die „Gene Ontology“-Kategorien in denen die Gene einer der beiden Gruppen überrepräsentiert sind, werden in Form eines farbigen Astes dargestellt. Um die Signifikanz dieser Assoziation statistisch abzusichern, wurde bei der GOSurfer Analyse ein  $\chi^2$ -Test ( $p < 0.05$ ) durchgeführt.

#### 4.13.5. „Clusteranalysen“

Mittels „Clusteranalysen“ können Gene und/oder Proben aufgrund ihrer Ähnlichkeit im Genexpressionsmuster gruppiert werden. Hierfür wurde das frei erhältliche Programm „TIGR Multiple Experiment Viewer“, (Saeed et al., 2003) verwendet. In dieses Programm wurden die Fluoreszenzsignale der „DNA-Chips und anschließend nach folgender Gleichung normalisiert:

$$\text{normalisierter Wert} = (F_i - mF_i) / \text{Stabwn } F_i$$

$F_i$ : Genexpression einer Probe (Fluoreszenzsignal)

$mF_i$ : mittlere Expression eines Gens in allen analysierten Proben

Stabwn  $F_i$ : Standardabweichung für ein Gen innerhalb aller analysierten Proben

Als mathematisches Maß für die Ähnlichkeit (Abstandsmaß) zwischen zwei Genen/Proben wurde die euklidische Distanz gewählt. Für die Ermittlung ähnlich exprimierter Gene wurde der „k-means“ Algorithmus verwendet. Dieser teilt die Gene basierend auf ihrem Expressionsmuster in isolierte Gruppen ein, deren Anzahl vor der Analyse bestimmt wird. Zu Beginn werden die Gene wahllos in die Gruppen verteilt und die mittlere Expressionshöhe der Gruppen bestimmt. Als nächster Schritt werden die Gene so verteilt, dass sie in den Cluster kommen, der ihrem Expressionsprofil am nächsten ist. Nachfolgend wird wieder die mittlere Expressionshöhe bestimmt. Dies geht solange weiter bis alle Gene optimal in ihre Gruppen passen. Für die „Clusteranalyse“ bei der die Ähnlichkeit der Proben ermittelt werden sollte,

wurde ein hierarchisches „Clustern“ durchgeführt. Dieser Algorithmus beginnt mit einem Gen/Probe. Nachfolgend wird das Gen oder die Probe ermittelt, welche die größte Ähnlichkeit zum ersten aufweist. Dieser Prozess geht solange weiter bis alle Gene in einer Beziehung zueinander stehen (Unterschied zum „k-means“-Algorithmus), die auch als Baumstruktur dargestellt werden kann.

## 4.14. Antikörper

### 4.14.1. Primäre Antikörper

anti-Aktin, monoklonaler Maus-AK	Onkogene
anti-BrdU ; monoclonale mouse AK	Roche
anti-CDK2 (D-12), monoklonaler Maus-AK	Santa Cruz
anti-CDK 4 (H-22), polyklonaler Kaninchen-AK	Santa Cruz
anti-Cyclin D1 (C-20), polyklonaler Kaninchen-AK	Santa Cruz
anti-Cyclin E (M-20), polyklonaler Kaninchen-AK	Santa Cruz
anti-ERK, polyklonaler Kaninchen-AK	Cell Signaling
anti-phospho ERK (Ser15), polyklonaler Kaninchen-AK	Cell Signaling
anti-IRF-1(M-20), polyklonaler Kaninchen-AK	Santa Cruz
anti-Lamin A/C (N-18), polyklonaler Ziegen-AK	Santa Cruz
anti-MEK, polyklonaler Kaninchen-AK	Cell Signaling
anti-phospho MEK (Ser15), polyklonaler Kaninchen-AK	Cell Signaling
anti-p27/Kip1, monoklonaler Maus-AK	BD Transduction
anti-p27 (N-20), polyklonaler Kaninchen-AK	Santa Cruz
anti-phospho-p27 (T-187), polyklonaler Kaninchen-AK	Santa Cruz
anti-pRB (4H1), monoklonaler Maus-AK	Cell Signaling
anti-phospho-pRB (Ser780), polyklonaler Kaninchen-AK	Cell Signaling
anti-Ubi (FL-76), polyklonaler Kaninchen-AK	Santa Cruz

### 4.14.2. sekundäre Antikörper

Donkey anti-Goat IgG, FITC-gekoppelt	Dianova
Goat anti-Rabbit IgG, Cy3-gekoppelt	Dianova
Goat anti-Rabbit IgG, FITC-gekoppelt	Dianova
Goat anti-Rabbit IgG, Peroxidase-gekoppelt	Dianova

Goat anti-Mouse IgG, FITC-gekoppelt

Dianova

Goat anti-Mouse IgG, Peroxidase-gekoppelt

Dianova

#### 4.15. Primer

##### PCR Primer:

Name	Sequenz	Nummer
Brd7Exon12	GAGGCTGAGGTGTTCCAGAG	P2190
Brd7Exon14	TCACCTGGAGTCACTTGCTG	P2191
Slfn2For	AATTTCCCCCGGGGACAATTGATGGGTACTAGACTTGAG	P2264
Slfn2Rev	AATTCGACGTCGACACCTGATGGGGCATTTCATCTGGAGTT	P2265
Vig1-9	AATTCCGCTCGAGCGGTAAGGGACAGACAAACTGCA	P2381
Vig1-10	AATTCCTCAAGCTTGGGTGATAGGCACACACCTGC	P2382
Vig1For2	AATTGAATTCGGGATGCTGGTGCCCACTGC	P2540
Vig1Rev2	AATTGTCGACTCACCAGTCCAGCTTCAGGTCAGC	P2545

##### qRT-PCR Primer:

Name	Sequenz	Nummer
muCcnD1for	AGTGCCTGCAGAAGGAGATT	P3133
muCcnD1rev	CACAACTTCTCGGCAGTCAA	P3134
p27-1	TTGGGTCTCAGGCAAACCTCT	P2375
p27-2	TCTGTTCTGTTGGCCCTTTT	P2376
Vigl-1	CTTCAACGTGGACGAAGACA	P2268
Vigl-2	GACGCTCCAAGAATGTTTCA	P2269
$\beta$ -Actin for	TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC	P3188
$\beta$ -Actin rev	TAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG	P3189
OligodT	TTTTTTTTTTTTTTTT	P1839

##### EMSA Primer:

Name	Sequenz	Nummer
Vig1Mut1+2 No2	GGACAGACAAACTGCACTCCTTTATAGGAGAA AGCAGATGCCTTAGAGGC	P2541
Vig1Mut1+2 No2Rev	GCCTCTAAGGCATCTGCTTTCTCCTATAAAGGA GTGCAGTTTGTCTGTCC	P2542
Vig1Mut3+4	CTTGGCTCTGGTCCAACCACAGAAAACAGAAAC TC	P2396
Vig1Mut3+4rev	GAGTTTCTGTTTTCTGTGGTTGGACCAGAGCCA AG	P2406
Vig1Mut5+6	GGTCCAACCTTTCATTTTCAGCAGCTCTGTTTAAC TGAGTC	P2399
Vig1Mut5+6rev	GACTCAGTTAAACAGAGCTGCTGAAAATGAAA GTTGGACC	P2409
Vig1WTFor	CTCTGGTCCAACCTTTCATTTTCAGAAAACAGAA ACTCTTTTAACT	P2567

Vig1WTRev	AGTTAAAAAGAGTTTCTGTTTTCTGAAAATGAA AGTTGGACCAGAG	P2568
Vig1WTFor2	TAAGGGACAGACAACTGCATTCTCTTTCTTTA TAGGAGA	P2569
Vig1WTRev2	TCTCCTATAAAGAAAGAGAATGCAGTTTGTCTG TCCCTTA	P2570
Mut IRF-E 2&3	CTCTGGTCCAACCACAGCAGCTCTTTTTAACT	P2598
Mut IRF-E 2&3 rev	AGTTAAAAAGAGCTGCTGTGGTTGGACCAGAG	P2554
TANILR (ISRE for)	AAGTGAAAGTGAAAGTGA	WW0332
TANIRL (ISRE rev)	TCACCTTTCACCTTTCACCT	WW0333

Mutagenese Primer:

Name	Sequenz	Nummer
Vig1Mut1+2 No2	GGACAGACAACTGCACTCCTTTATAGGAGAA AGCAGATGCCTTAGAGGC	P2541
Vig1Mut1+2 No2Rev	GCCTCTAAGGCATCTGCTTTCTCCTATAAAGGA GTGCAGTTTGTCTGTCC	P2542
Vig1Mut3	CTTGGCTCTGGTCCAACCATTTTCAGAAAACAG	P2394
Vig1Mut3rev	GAGTTTCTGTTTTCTGAAAATGGTTGGACCAGA GCCAAG	P2404
Vig1Mut4	CTTGGCTCTGGTCCAACCTTTCACAGAAAACAGA	P2395
Vig1Mut4rev	GAGTTTCTGTTTTCTGTGAAAGTTGGACCAGAG CCAAG	P2405
Vig1Mut3+4	CTTGGCTCTGGTCCAACCACAGAAAACAGAAAC TC	P2396
Vig1Mut3+4rev	GAGTTTCTGTTTTCTGTGGTTGGACCAGAGCCA AG	P2406
Vig1Mut5	CAACTTTCATTTTCAGCAGAACTCTGTTTAACT	P2397
Vig1Mut5rev	GACTCAGTTAAACAGAGTTTCTGCTGAAAATGA	P2407
Vig1Mut6	CAACTTTCATTTTCAGAAAACAGCTCTGTTTAA	P2398
Vig1Mut6rev	GACTCAGTTAAACAGAGCTGTTTTCTGAAAATG	P2408
Vig1Mut5+6	GGTCCAACCTTTCATTTTCAGCAGCTCTGTTTAA TGAGTC	P2399
Vig1Mut5+6rev	GACTCAGTTAAACAGAGCTGCTGAAAATGAAA GTTGGACC	P2409

**4.16. Vektoren****4.16.1. Verwendete Vektoren**

pMT7HEIRF (No.694)	F. Schaper, HZI – Braunschweig
pCIN4Slfn2 (No.3138)	(Schwarz et al., 1998)
pBTVBC-1 (No.1577)	A. Kröger, HZI – Braunschweig; Kwissa et al., (2002). J. Mol. Med. 78, 495-506
pVBC3p27P (No.2434)	A. Kröger, HZI – Braunschweig

pVBC3rtTA2GN (No.2514)	A. Kröger, HZI – Braunschweig
pVBC3CDK2P (No.2428)	A. Kröger, HZI – Braunschweig
pGL3basic (No.1862)	Promega
pVBC3myc-Tag (No.2676)	A. Kröger, HZI – Braunschweig
pA3lucCyclinD1 (No.2422)	R.G. Pestell, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA
pBabe-cyclin D1 (No.2423)	B. Law Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN
pSRLcd1a (No.2688)	A. Kröger, HZI – Braunschweig; (Kröger et al., 2007)
pSR-GL4 (No.2686)	M. Scherr, MHH – Hannover; (Scherr et al., 2003)
pSRp27 (No.2985)	A. Kröger, HZI – Braunschweig

#### 4.16.2. Hergestellte Vektoren

- pCR3.1Brd7Ex15/16 (No.3135): Plasmid zur Herstellung einer Brd7 Northern-Sonde. Die Exons15 und 16 wurden mittels PCR (P2190/P2191) von der Brd7 cDNA amplifiziert und in den Vektor pCR3.1 (Eucaryontic TA Expressions Kit, Biodirectional; Invitrogen) kloniert.
- pVBC2Slfn2mychis (No.3139): Plasmid zur Expression eines myc/His getaggten Slfn2 Proteins. Die cDNA des murinen Slfn2 Gens wurde mittels PCR (P2264/P2265) von dem Vektor pCIN4Slfn2 (No.3138) amplifiziert, SmaI verdaut und mit dem SmaI geöffneten Vektor pVBC2mycHis (No.2678) ligiert.
- pBTVC3Slfn2mychis (No.3140): Plasmid zur Expression eines myc/His getaggten Slfn2 Proteins. Der Vektor pVBC2Slfn2mychis (No.3139) wurde mit MfeI und HindIII verdaut, um ein Slfn2mychis Fragment zu generieren. Das Fragment wurde dann mit dem EcoRI/HindIII geöffneten Vektor pBTVC-1 (No.1577) ligiert.
- pVBC3p27GN (No.3141): Plasmid zur Expression von p27 bei gleichzeitiger Expression von eGFP. Der Vektor pVBC3p27P (No.2434) wurde mit PacI und BamHI verdaut, um ein p27 Fragment zu generieren. Das Fragment wurde dann mit dem

	BamHI/PacI geöffneten Vektor pVBC3rtTA2GN (No.2514) ligiert.
pVBC3CDK2GN (No.2957):	Plasmid zur Expression von CDK2 bei gleichzeitiger Expression von eGFP. Der Vektor pVBC3CDK2P (No.2428) wurde mit PacI und BamHI verdaut, um ein CDK2 Fragment zu generieren. Das Fragment wurde dann mit dem BamHI/PacI geöffneten Vektor pVBC3rtTA2GN (No.2514) ligiert.
pVBC3mycVig1 (No.3129):	Plasmid zur Expression eines myc getaggtten Viperin Proteins. Die cDNA des murinen Viperin Gens wurde mittels PCR (P2540/P2545) von einem cDNA Gemisch aus 35/1-22 EK3 Zellen amplifiziert, EcoRI und SalI verdaut und mit dem EcoRI/SalI geöffneten Vektor pVBC3myc-Tag (No.2676) ligiert.
pVBC3mycVig1GN (No.3142):	Plasmid zur Expression von myc getaggttem Viperin bei gleichzeitiger Expression von eGFP. Der Vektor pVBC3mycVig1 (No.3129) wurde mit SalI und XhoI verdaut, um ein Viperin Fragment zu generieren. Das Fragment wurde dann mit dem SalI/XhoI geöffneten Vektor pVBC3p27GN (No.3141) ligiert.
pGL3Vig1WT (No.2724):	Reportergenkonstrukt für Luziferaseaktivitätstests; Der murine Viperin Promoter wurden mittels PCR (P2381/P2382) von genomischer DNA aus IB10 ES-Zellen amplifiziert. Nach dem XhoI/HindIII Verdau, wurde das Fragment in den und in den XhoI/HindIII geöffneten Vektor pGL3basic (No.1862) ligiert.
pGL3Vig1P-Mut1+2 (No.2823):	Reportergenkonstrukt für Luziferaseaktivitätstests; Gerichtete Mutagenese des IRF-E#1 im w.t. Viperin Promoters aus pGL3Vig1WT (No.2724) mit den Primern P2541 und P2542.
pGL3Vig1P-Mut3 (No.2725):	Reportergenkonstrukt für Luziferaseaktivitätstests; Gerichtete Mutagenese des IRF-E#2 im w.t. Viperin Promoters aus pGL3Vig1WT (No.2724) mit den Primern P2394 und P2404.

- pGL3Vig1P-Mut4 (No.2726): Reporter-genkonstrukt für Luziferaseaktivitätstests; Gerichtete Mutagenese des IRF-E#2 im w.t. Viperin Promoters aus pGL3Vig1WT (No.2724) mit den Primern P2395 und P2405.
- pGL3Vig1P-Mut3+4 (No.2720): Reporter-genkonstrukt für Luziferaseaktivitätstests; Gerichtete Mutagenese des IRF-E#2 im w.t. Viperin Promoters aus pGL3Vig1WT (No.2724) mit den Primern P2396 und P2406.
- pGL3Vig1P-Mut5 (No.2721): Reporter-genkonstrukt für Luziferaseaktivitätstests; Gerichtete Mutagenese des IRF-E#3 im w.t. Viperin Promoters aus pGL3Vig1WT (No.2724) mit den Primern P2397 und P2407.
- pGL3Vig1P-Mut6 (No.2722): Reporter-genkonstrukt für Luziferaseaktivitätstests; Gerichtete Mutagenese des IRF-E#3 im w.t. Viperin Promoters aus pGL3Vig1WT (No.2724) mit den Primern P2398 und P2408.
- pGL3Vig1P-Mut5+6 (No.2723): Reporter-genkonstrukt für Luziferaseaktivitätstests; Gerichtete Mutagenese des IRF-E#3 im w.t. Viperin Promoters aus pGL3Vig1WT (No.2724) mit den Primern P2399 und P2409.



## 5. Abkürzungen

°C	Grad Celsius
$\alpha$	alpha <i>aber auch</i> anti
$\beta$	beta
$\gamma$	gamma
$\varepsilon$	epsilon
$\delta$	delta
$\kappa$	kappa
$\lambda$	lambda
$\tau$	tau
$\mu$	my <i>aber auch</i> mikro
$\omega$	omega
$\Omega$	Ohm
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AP-1	Activator Protein 1
APCs	Antigenpräsentierende Zellen
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BCA	Bicinchoninic acid
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
CAK	CDK activating kinase
CDC	Cell Division Cycle
CDK	Cyclin Dependent Kinase
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ci	Curie
Cip1	CDK-interacting protein 1 (Synonym: p21)
CIAP	calf intestinal alkaline phosphatase
CKI	cyclin dependent kinase inhibitor
c-myc	v- <i>myc</i> avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CpG	unmethylierte DNA
Cu	Kupfer

CVB3	Coxsackieviren des Typ 3B
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dd	doppelt destilliert
DMEM	Dulbecco's modification of Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase I	Desoxyribonuklease I
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
Dox <i>oder</i> D	Doxozyklin
ds	doppelsträngig
E <i>oder</i> E2	Östrogen
E2F	ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
eGFP	enhanced green fluorescent protein
eIF2	eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor-2
ERK	extracellular signal-regulated kinase
et al.	et alii
F	Farat
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanate
g	Gramm <i>aber auch</i> Fallbeschleunigung
G	Guanosin
G418	Aminoglycosid-2'-Deoxystreptin (Gentamycin-Derivat)
GAF	gamma activated factor
GAS	gamma activated site
GBP	Guanylate Binding Protein
GTP	Guanosintriphosphat
CIITA	Class II Tansactivator
h	Stunde
H	Hygromycin
H <sub>2</sub> O	Wasser
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
hER	humaner Östrogenrezeptor (Carboxyterminus)
HER	human epidermal growth factor-like receptor
His	Histidinol
Hyg	Hygromycin-B-Phosphotransferase

IAD	Interferon association domain
ICS	Interferon consensus sequence
i.d.R.	in der Regel
IFN	Interferon
IL	Interleukin
INK4	inhibitor of CDK4
iNOS	inducible nitric oxide synthetase
IP	Immunpräzipitation
IPCS	IRF-1 p53 common sequence
ips	Impulse pro Sekunde
IRES	internal ribosomal entry site
IRF	Interferon regulatory factor
IRF-E	Interferon regulatory factor-element
ISG	Interferon stimulated gene
ISGF3	Interferon stimulated gene factor 3
ISRE	Interferon stimulated response element
JEV	Japanese Encephalitis Viren
k	Kilo
Kip1	kinase inhibitory protein 1 (Synonym: p27)
KIS	kinase interacting stathmin
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
LiCl	Lithiumchlorid
LMP-2	low molecular weight protein-2
LPS	Lipopolysaccharide
LTR	long terminal repeat
m	milli <i>aber auch</i> Meter
M	Molarität
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MEF	mouse embryo fibroblast
MEK	mitogen activated ERK-kinase
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MPF	M-phase promoting factor
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
myc	Transkriptionsfaktor im MAP-Kinase Signalweg
MYT-1	membrane-associated tyrosine- and threoninespecific cdc2-inhibitory kinase

n	nano
N	Normalität
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Natriumvanadat
Neo	Neomycin-Phosphotransferase
NDV	Newcastle Disease Virus
NF-κB	Nuclear Factor kappa B
NK	Natürliche Killerzellen
NLS	Nuclear Localization Signal
NO	Stickstoffmonoxid
NPM	Nucleophosmin
nt	Nukleotid
2'-5' OAS	5'-Oligoadenylat-Synthetase
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm Messwellenlänge
ORF	Open Reading Frame
p	piko
P	Phosphor
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI	Propidiumjodid
PI(3)K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKR	Proteinkinase R
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pRB	Retinoblastomprotein
PRD	Positive Regulatory Domain
Ras	GTPase, aktiviert den MAP-Kinase Signalweg
RIPA	Radioimmunpräzipitationsassay
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA interference
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
rtTA	Tetrazyklin-abhängiger reverser Transaktivator
sec	Sekunde
SCF	SKP1/Cullin-1/F-Box-Protein
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
shRNA	small-hairpin Ribonukleinsäure
SKP1/2	S-phase Kinase associated Protein 1/2

SP1	ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor
S-Phase	Synthesephase des Zellzyklus
ss	einzelsträngig
SSC	Natriumchlorid/Natriumcitrat
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
STET	Natriumchlorid/Tris/EDTA/Triton X-100
T	Thymin <i>aber auch</i> Threonin
TAE	Tris/Essigsäure/EDTA
TAg	SV40 Large Tumor Antigen
TAP-1	Transporter associated with Antigen Processing-1
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung/Tween-20
TCR	T Zell Rezeptor
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TEP	Trypsin-EDTA-Puffer
TGF-β	Transforming Growth Factor-beta
Th1/2	T-Helferzellen des Typs I oder II
Thr	Threonin
Tet	Tetrazyklin
Tet-Off	Tetrazyklin-abhängiges Expressionssystem
Tet-On	Tetrazyklin-abhängiges Expressionssystem
TetR	Tetrazyklin-Repressordomäne
TLR	Toll-like receptor
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
Triton X-100	p-Isooctylphenylpolyoxyethylen
tTA	Tetrazyklin-abhängiger Transaktivator
Tween-20	Polyoxyethylen(20)sorbitanmonolaureat
U	Uracil <i>aber auch</i> Unit
ubi	Ubiquitin
UTR	Untranslated Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
VSV	Vesikular Stomatitis Virus
v/v	volume per volume (Volumenprozent)
WEE1	Tyrosinkinase, homolog zur wee1-Kinase von <i>S. pombe</i>
w/o	mit/ohne
w/v	weight per volume (Gewichtsprozent)
w.t.	Wildtyp
Y	Tyrosin

## 6. Literaturverzeichnis

Abdollahi, A., Lord, K. A., Hoffman-Liebermann, B., and Liebermann, D. A. (1991). Interferon regulatory factor 1 is a myeloid differentiation primary response gene induced by interleukin 6 and leukemia inhibitory factor: role in growth inhibition. *Cell Growth Differ* 2, 401-407.

Ahmed, M., McKenzie, M. O., Puckett, S., Hojnacki, M., Poliquin, L., and Lyles, D. S. (2003). Ability of the matrix protein of vesicular stomatitis virus to suppress beta interferon gene expression is genetically correlated with the inhibition of host RNA and protein synthesis. *J Virol* 77, 4646-4657.

Aktas, H., Cai, H., and Cooper, G. M. (1997). Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and the Cdk inhibitor p27KIP1. *Mol Cell Biol* 17, 3850-3857.

Anderson, S. L., Carton, J. M., Lou, J., Xing, L., and Rubin, B. Y. (1999). Interferon-induced guanylate binding protein-1 (GBP-1) mediates an antiviral effect against vesicular stomatitis virus and encephalomyocarditis virus. *Virology* 256, 8-14.

Andrejeva, J., Childs, K. S., Young, D. F., Carlos, T. S., Stock, N., Goodbourn, S., and Randall, R. E. (2004). The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17264-17269.

Ank, N., West, H., and Paludan, S. R. (2006). IFN-lambda: novel antiviral cytokines. *J Interferon Cytokine Res* 26, 373-379.

Aprelikova, O., Xiong, Y., and Liu, E. T. (1995). Both p16 and p21 families of cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors block the phosphorylation of cyclin-dependent kinases by the CDK-activating kinase. *J Biol Chem* 270, 18195-18197.

Arase, N., Arase, H., Park, S. Y., Ohno, H., Ra, C., and Saito, T. (1997). Association with FcRgamma is essential for activation signal through NKR-P1 (CD161) in natural killer (NK) cells and NK1.1+ T cells. *J Exp Med* 186, 1957-1963.

Arber, N., Doki, Y., Han, E. K., Sgambato, A., Zhou, P., Kim, N. H., Delohery, T., Klein, M. G., Holt, P. R., and Weinstein, I. B. (1997). Antisense to cyclin D1 inhibits the growth and tumorigenicity of human colon cancer cells. *Cancer Res* 57, 1569-1574.

Arnheiter, H., Frese, M., Kambadur, R., Meier, E., and Haller, O. (1996). Mx transgenic mice--animal models of health. *Curr Top Microbiol Immunol* 206, 119-147.

Arons, E., Kunin, V., Schechter, C., and Ehrlich, R. (2001). Organization and functional analysis of the mouse transporter associated with antigen processing 2 promoter. *J Immunol* 166, 3942-3951.

Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., *et al.* (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 25, 25-29.

Au, W. C., Moore, P. A., Lowther, W., Juang, Y. T., and Pitha, P. M. (1995). Identification of a member of the interferon regulatory factor family that binds to the interferon-stimulated

response element and activates expression of interferon-induced genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11657-11661.

Bach, E. A., Aguet, M., and Schreiber, R. D. (1997). The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol* 15, 563-591.

Baron, U., Freundlieb, S., Gossen, M., and Bujard, H. (1995). Co-regulation of two gene activities by tetracycline via a bidirectional promoter. *Nucleic Acids Res* 23, 3605-3606.

Bartek, J., and Lukas, J. (2001). p27 destruction: Cks1 pulls the trigger. *Nat Cell Biol* 3, E95-98.

Benech, P., Vigneron, M., Peretz, D., Revel, M., and Chebath, J. (1987). Interferon-responsive regulatory elements in the promoter of the human 2',5'-oligo(A) synthetase gene. *Mol Cell Biol* 7, 4498-4504.

Boehm, M., Yoshimoto, T., Crook, M. F., Nallamshetty, S., True, A., Nabel, G. J., and Nabel, E. G. (2002). A growth factor-dependent nuclear kinase phosphorylates p27(Kip1) and regulates cell cycle progression. *Embo J* 21, 3390-3401.

Boudinot, P., Massin, P., Blanco, M., Riffault, S., and Benmansour, A. (1999). vig-1, a new fish gene induced by the rhabdovirus glycoprotein, has a virus-induced homologue in humans and shares conserved motifs with the MoaA family. *J Virol* 73, 1846-1852.

Boudinot, P., Riffault, S., Salhi, S., Carrat, C., Sedlik, C., Mahmoudi, N., Charley, B., and Benmansour, A. (2000). Vesicular stomatitis virus and pseudorabies virus induce a vig1/cig5 homologue in mouse dendritic cells via different pathways. *J Gen Virol* 81, 2675-2682.

Briken, V., Ruffner, H., Schultz, U., Schwarz, A., Reis, L. F., Strehlow, I., Decker, T., and Staeheli, P. (1995). Interferon regulatory factor 1 is required for mouse Gbp gene activation by gamma interferon. *Mol Cell Biol* 15, 975-982.

Buttmann, M., Berberich-Siebelt, F., Serfling, E., and Rieckmann, P. (2007). Interferon-beta is a potent inducer of interferon regulatory factor-1/2-dependent IP-10/CXCL10 expression in primary human endothelial cells. *J Vasc Res* 44, 51-60.

Carter, L. L., and Murphy, K. M. (1999). Lineage-specific requirement for signal transducer and activator of transcription (Stat)4 in interferon gamma production from CD4(+) versus CD8(+) T cells. *J Exp Med* 189, 1355-1360.

Chang, C. H., Hammer, J., Loh, J. E., Fodor, W. L., and Flavell, R. A. (1992). The activation of major histocompatibility complex class I genes by interferon regulatory factor-1 (IRF-1). *Immunogenetics* 35, 378-384.

Chatterjee-Kishore, M., Wright, K. L., Ting, J. P., and Stark, G. R. (2000). How Stat1 mediates constitutive gene expression: a complex of unphosphorylated Stat1 and IRF1 supports transcription of the LMP2 gene. *Embo J* 19, 4111-4122.

Chin, K. C., and Cresswell, P. (2001). Viperin (cig5), an IFN-inducible antiviral protein directly induced by human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 15125-15130.

- Ciaparrone, M., Yamamoto, H., Yao, Y., Sgambato, A., Cattoretti, G., Tomita, N., Monden, T., Rotterdam, H., and Weinstein, I. B. (1998). Localization and expression of p27KIP1 in multistage colorectal carcinogenesis. *Cancer Res* 58, 114-122.
- Coccia, E. M., Severa, M., Giacomini, E., Monneron, D., Remoli, M. E., Julkunen, I., Cella, M., Lande, R., and Uze, G. (2004). Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 34, 796-805.
- Contente, S., Attard, F. A., Yeh, T. J., Buchhagen, D. L., and Friedman, R. M. (2003). Deregulated expression of interferon regulatory factor-1 in oncogene-transformed mouse fibroblasts. *J Interferon Cytokine Res* 23, 639-647.
- Cordon-Cardo, C., Koff, A., Drobnjak, M., Capodieci, P., Osman, I., Millard, S. S., Gaudin, P. B., Fazzari, M., Zhang, Z. F., Massague, J., and Scher, H. I. (1998). Distinct altered patterns of p27KIP1 gene expression in benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 90, 1284-1291.
- Cui, X., and Churchill, G. A. (2003). Statistical tests for differential expression in cDNA microarray experiments. *Genome Biol* 4, 210.
- De Benedetti, A., and Baglioni, C. (1984). Inhibition of mRNA binding to ribosomes by localized activation of dsRNA-dependent protein kinase. *Nature* 311, 79-81.
- Dinter, H., and Hauser, H. (1987). Superinduction of the human interferon-beta promoter. *Embo J* 6, 599-604.
- Dornan, D., Eckert, M., Wallace, M., Shimizu, H., Ramsay, E., Hupp, T. R., and Ball, K. L. (2004). Interferon regulatory factor 1 binding to p300 stimulates DNA-dependent acetylation of p53. *Mol Cell Biol* 24, 10083-10098.
- Drew, P. D., Franzoso, G., Becker, K. G., Bours, V., Carlson, L. M., Siebenlist, U., and Ozato, K. (1995). NF kappa B and interferon regulatory factor 1 physically interact and synergistically induce major histocompatibility class I gene expression. *J Interferon Cytokine Res* 15, 1037-1045.
- Dufourny, B., van Teeffelen, H. A., Hamelers, I. H., Sussenbach, J. S., and Steenbergh, P. H. (2000). Stabilization of cyclin D1 mRNA via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in MCF-7 human breast cancer cells. *J Endocrinol* 166, 329-338.
- Durbin, J. E., Hackenmiller, R., Simon, M. C., and Levy, D. E. (1996). Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell* 84, 443-450.
- Eckert, M., Meek, S. E., and Ball, K. L. (2006). A novel repressor domain is required for maximal growth inhibition by the IRF-1 tumor suppressor. *J Biol Chem* 281, 23092-23102.
- Efrat, S., and Kaempfer, R. (1984). Control of biologically active interleukin 2 messenger RNA formation in induced human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 2601-2605.
- Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O., and Botstein, D. (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14863-14868.



- Ernest, M. J., DeLap, L., and Feigelson, P. (1978). Induction of hepatic tyrosine aminotransferase mRNA by protein synthesis inhibitors. *J Biol Chem* 253, 2895-2897.
- Escalante, C. R., Yie, J., Thanos, D., and Aggarwal, A. K. (1998). Structure of IRF-1 with bound DNA reveals determinants of interferon regulation. *Nature* 391, 103-106.
- Farrar, M. A., and Schreiber, R. D. (1993). The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol* 11, 571-611.
- Foss, G. S., and Prydz, H. (1999). Interferon regulatory factor 1 mediates the interferon-gamma induction of the human immunoproteasome subunit multicatalytic endopeptidase complex-like 1. *J Biol Chem* 274, 35196-35202.
- Fujita, T., Reis, L. F., Watanabe, N., Kimura, Y., Taniguchi, T., and Vilcek, J. (1989). Induction of the transcription factor IRF-1 and interferon-beta mRNAs by cytokines and activators of second-messenger pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 9936-9940.
- Fujita, T., Sakakibara, J., Sudo, Y., Miyamoto, M., Kimura, Y., and Taniguchi, T. (1988). Evidence for a nuclear factor(s), IRF-1, mediating induction and silencing properties to human IFN-beta gene regulatory elements. *Embo J* 7, 3397-3405.
- Funk, J. O., and Kind, P. (1997). [Cell cycle control, genetic instability and cancer]. *Hautarzt* 48, 157-165.
- Georgel, P., Jiang, Z., Kunz, S., Janssen, E., Mols, J., Hoebe, K., Bahram, S., Oldstone, M. B., and Beutler, B. (2007). Vesicular stomatitis virus glycoprotein G activates a specific antiviral Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Virology*.
- Ghera, P., Hooft van Huijsduijnen, R., Whelan, J., and DeLamar, J. F. (1992). Labile proteins play a dual role in the control of endothelial leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) gene regulation. *J Biol Chem* 267, 19226-19232.
- Gilly, M., Damore, M. A., and Wall, R. (1996). A promoter ISRE and dual 5' YY1 motifs control IFN-gamma induction of the IRG-47 G-protein gene. *Gene* 179, 237-244.
- Gossen, M., and Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 5547-5551.
- Grandori, C., Cowley, S. M., James, L. P., and Eisenman, R. N. (2000). The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 653-699.
- Grewal, T. S., Genever, P. G., Brabbs, A. C., Birch, M., and Skerry, T. M. (2000). Best5: a novel interferon-inducible gene expressed during bone formation. *Faseb J* 14, 523-531.
- Gribaudo, G., Lembo, D., Cavallo, G., Landolfo, S., and Lengyel, P. (1991). Interferon action: binding of viral RNA to the 40-kilodalton 2'-5'-oligoadenylate synthetase in interferon-treated HeLa cells infected with encephalomyocarditis virus. *J Virol* 65, 1748-1757.
- Haines, D. S., Strauss, K. I., and Gillespie, D. H. (1991). Cellular response to double-stranded RNA. *J Cell Biochem* 46, 9-20.
- Hall, M., and Peters, G. (1996). Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer. *Adv Cancer Res* 68, 67-108.

- Haller, O., Kochs, G., and Weber, F. (2006). The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology* 344, 119-130.
- Harada, H., Fujita, T., Miyamoto, M., Kimura, Y., Maruyama, M., Furia, A., Miyata, T., and Taniguchi, T. (1989). Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes. *Cell* 58, 729-739.
- Harada, H., Kitagawa, M., Tanaka, N., Yamamoto, H., Harada, K., Ishihara, M., and Taniguchi, T. (1993). Anti-oncogenic and oncogenic potentials of interferon regulatory factors-1 and -2. *Science* 259, 971-974.
- Harada, H., Takahashi, E., Itoh, S., Harada, K., Hori, T. A., and Taniguchi, T. (1994). Structure and regulation of the human interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2 genes: implications for a gene network in the interferon system. *Mol Cell Biol* 14, 1500-1509.
- Harbour, J. W., and Dean, D. C. (2000). The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev* 14, 2393-2409.
- Harper, J. W. (2001). Protein destruction: adapting roles for Cks proteins. *Curr Biol* 11, R431-435.
- Harris, N., Buller, R. M., and Karupiah, G. (1995). Gamma interferon-induced, nitric oxide-mediated inhibition of vaccinia virus replication. *J Virol* 69, 910-915.
- Helbig, K. J., Lau, D. T., Semendric, L., Harley, H. A., and Beard, M. R. (2005). Analysis of ISG expression in chronic hepatitis C identifies viperin as a potential antiviral effector. *Hepatology* 42, 702-710.
- Hengst, L., and Reed, S. I. (1996). Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. *Science* 271, 1861-1864.
- Hobart, M., Ramassar, V., Goes, N., Urmson, J., and Halloran, P. F. (1997). IFN regulatory factor-1 plays a central role in the regulation of the expression of class I and II MHC genes in vivo. *J Immunol* 158, 4260-4269.
- Ishida, S., Huang, E., Zuzan, H., Spang, R., Leone, G., West, M., and Nevins, J. R. (2001). Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis. *Mol Cell Biol* 21, 4684-4699.
- Itoh, S., Harada, H., Nakamura, Y., White, R., and Taniguchi, T. (1991). Assignment of the human interferon regulatory factor-1 (IRF1) gene to chromosome 5q23-q31. *Genomics* 10, 1097-1099.
- Jackman, M. R., and Pines, J. N. (1997). Cyclins and the G2/M transition. *Cancer Surv* 29, 47-73.
- Joyce, D., Bouzahzah, B., Fu, M., Albanese, C., D'Amico, M., Steer, J., Klein, J. U., Lee, R. J., Segall, J. E., Westwick, J. K., *et al.* (1999). Integration of Rac-dependent regulation of cyclin D1 transcription through a nuclear factor-kappaB-dependent pathway. *J Biol Chem* 274, 25245-25249.

- Julkunen, I., Sareneva, T., Pirhonen, J., Ronni, T., Melen, K., and Matikainen, S. (2001). Molecular pathogenesis of influenza A virus infection and virus-induced regulation of cytokine gene expression. *Cytokine Growth Factor Rev* 12, 171-180.
- Kamijo, R., Harada, H., Matsuyama, T., Bosland, M., Gerecitano, J., Shapiro, D., Le, J., Koh, S. I., Kimura, T., Green, S. J., and et al. (1994). Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. *Science* 263, 1612-1615.
- Kardinal, C., Dangers, M., Kardinal, A., Koch, A., Brandt, D. T., Tamura, T., and Welte, K. (2006). Tyrosine phosphorylation modulates binding preference to cyclin-dependent kinases and subcellular localization of p27Kip1 in the acute promyelocytic leukemia cell line NB4. *Blood* 107, 1133-1140.
- Kato, J. Y., Matsuoka, M., Polyak, K., Massague, J., and Sherr, C. J. (1994). Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27Kip1) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell* 79, 487-496.
- Kelly, K., Cochran, B. H., Stiles, C. D., and Leder, P. (1983). Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. *Cell* 35, 603-610.
- Kerr, I. M., and Brown, R. E. (1978). pppA2'p5'A2'p5'A: an inhibitor of protein synthesis synthesized with an enzyme fraction from interferon-treated cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 256-260.
- Kimura, T., Nakayama, K., Penninger, J., Kitagawa, M., Harada, H., Matsuyama, T., Tanaka, N., Kamijo, R., Vilcek, J., Mak, T. W., and et al. (1994). Involvement of the IRF-1 transcription factor in antiviral responses to interferons. *Science* 264, 1921-1924.
- Kirchhoff, S., and Hauser, H. (1999). Cooperative activity between HER oncogenes and the tumor suppressor IRF-1 results in apoptosis. *Oncogene* 18, 3725-3736.
- Kirchhoff, S., Koromilas, A. E., Schaper, F., Grashoff, M., Sonenberg, N., and Hauser, H. (1995). IRF-1 induced cell growth inhibition and interferon induction requires the activity of the protein kinase PKR. *Oncogene* 11, 439-445.
- Kirchhoff, S., Kröger, A., Cruz, H., Tummeler, M., Schaper, F., Koster, M., and Hauser, H. (1996). Regulation of cell growth by IRF-1 in BHK-21 cells. *Cytotechnology* 22, 147-156.
- Kirchhoff, S., Schaper, F., and Hauser, H. (1993). Interferon regulatory factor 1 (IRF-1) mediates cell growth inhibition by transactivation of downstream target genes. *Nucleic Acids Res* 21, 2881-2889.
- Kishimoto, T., and Okumura, E. (1997). In vivo regulation of the entry into M-phase: initial activation and nuclear translocation of cyclin B/Cdc2. *Prog Cell Cycle Res* 3, 241-249.
- Koromilas, A. E., Roy, S., Barber, G. N., Katze, M. G., and Sonenberg, N. (1992). Malignant transformation by a mutant of the IFN-inducible dsRNA-dependent protein kinase. *Science* 257, 1685-1689.
- Kotenko, S. V., Gallagher, G., Baurin, V. V., Lewis-Antes, A., Shen, M., Shah, N. K., Langer, J. A., Sheikh, F., Dickensheets, H., and Donnelly, R. P. (2003). IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol* 4, 69-77.

- Kotoshiba, S., Kamura, T., Hara, T., Ishida, N., and Nakayama, K. I. (2005). Molecular dissection of the interaction between p27 and Kip1 ubiquitylation-promoting complex, the ubiquitin ligase that regulates proteolysis of p27 in G1 phase. *J Biol Chem* 280, 17694-17700.
- Krimpenfort, P., Quon, K. C., Mooi, W. J., Loonstra, A., and Berns, A. (2001). Loss of p16Ink4a confers susceptibility to metastatic melanoma in mice. *Nature* 413, 83-86.
- Kröger, A., Dallugge, A., Kirchhoff, S., and Hauser, H. (2003). IRF-1 reverts the transformed phenotype of oncogenically transformed cells in vitro and in vivo. *Oncogene* 22, 1045-1056.
- Kröger, A., Koster, M., Schroeder, K., Hauser, H., and Mueller, P. P. (2002). Activities of IRF-1. *J Interferon Cytokine Res* 22, 5-14.
- Kröger, A., Ortmann, D., Krohne, T. U., Mohr, L., Blum, H. E., Hauser, H., and Geissler, M. (2001). Growth suppression of the hepatocellular carcinoma cell line Hepa1-6 by an activatable interferon regulatory factor-1 in mice. *Cancer Res* 61, 2609-2617.
- Kröger, A., Stirnweiss, A., Pulverer, J. E., Klages, K., Grashoff, M., Reimann, J., and Hauser, H. (2007). Tumor suppression by IFN regulatory factor-1 is mediated by transcriptional down-regulation of cyclin D1. *Cancer Res* 67, 2972-2981.
- Krug, R. M., Shaw, M., Broni, B., Shapiro, G., and Haller, O. (1985). Inhibition of influenza viral mRNA synthesis in cells expressing the interferon-induced Mx gene product. *J Virol* 56, 201-206.
- Kumar, V., Green, S., Staub, A., and Chambon, P. (1986). Localisation of the oestradiol-binding and putative DNA-binding domains of the human oestrogen receptor. *Embo J* 5, 2231-2236.
- LaBaer, J., Garrett, M. D., Stevenson, L. F., Slingerland, J. M., Sandhu, C., Chou, H. S., Fattaey, A., and Harlow, E. (1997). New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev* 11, 847-862.
- Langer, J. A., Cutrone, E. C., and Kotenko, S. (2004). The Class II cytokine receptor (CRF2) family: overview and patterns of receptor-ligand interactions. *Cytokine Growth Factor Rev* 15, 33-48.
- Lee, J., Wu, C. C., Lee, K. J., Chuang, T. H., Katakura, K., Liu, Y. T., Chan, M., Tawatao, R., Chung, M., Shen, C., *et al.* (2006). Activation of anti-hepatitis C virus responses via Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1828-1833.
- Lee, R. J., Albanese, C., Fu, M., D'Amico, M., Lin, B., Watanabe, G., Haines, G. K., 3rd, Siegel, P. M., Hung, M. C., Yarden, Y., *et al.* (2000). Cyclin D1 is required for transformation by activated Neu and is induced through an E2F-dependent signaling pathway. *Mol Cell Biol* 20, 672-683.
- Lenardo, M. J., Fan, C. M., Maniatis, T., and Baltimore, D. (1989). The involvement of NF-kappa B in beta-interferon gene regulation reveals its role as widely inducible mediator of signal transduction. *Cell* 57, 287-294.
- Levy, D. E., Kessler, D. S., Pine, R., Reich, N., and Darnell, J. E., Jr. (1988). Interferon-induced nuclear factors that bind a shared promoter element correlate with positive and negative transcriptional control. *Genes Dev* 2, 383-393.

- Lin, S., Wang, W., Wilson, G. M., Yang, X., Brewer, G., Holbrook, N. J., and Gorospe, M. (2000). Down-regulation of cyclin D1 expression by prostaglandin A(2) is mediated by enhanced cyclin D1 mRNA turnover. *Mol Cell Biol* 20, 7903-7913.
- Lin, Y. L., Huang, Y. L., Ma, S. H., Yeh, C. T., Chiou, S. Y., Chen, L. K., and Liao, C. L. (1997). Inhibition of Japanese encephalitis virus infection by nitric oxide: antiviral effect of nitric oxide on RNA virus replication. *J Virol* 71, 5227-5235.
- Liu, J., Cao, S., Herman, L. M., and Ma, X. (2003). Differential regulation of interleukin (IL)-12 p35 and p40 gene expression and interferon (IFN)-gamma-primed IL-12 production by IFN regulatory factor 1. *J Exp Med* 198, 1265-1276.
- Liu, J., Guan, X., and Ma, X. (2005). Interferon regulatory factor 1 is an essential and direct transcriptional activator for interferon {gamma}-induced RANTES/CCl5 expression in macrophages. *J Biol Chem* 280, 24347-24355.
- Loda, M., Cukor, B., Tam, S. W., Lavin, P., Fiorentino, M., Draetta, G. F., Jessup, J. M., and Pagano, M. (1997). Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat Med* 3, 231-234.
- Lohoff, M., Ferrick, D., Mittrucker, H. W., Duncan, G. S., Bischof, S., Rollinghoff, M., and Mak, T. W. (1997). Interferon regulatory factor-1 is required for a T helper 1 immune response in vivo. *Immunity* 6, 681-689.
- Magram, J., Connaughton, S. E., Warrier, R. R., Carvajal, D. M., Wu, C. Y., Ferrante, J., Stewart, C., Sarmiento, U., Faherty, D. A., and Gately, M. K. (1996). IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses. *Immunity* 4, 471-481.
- Malmgaard, L. (2004). Induction and regulation of IFNs during viral infections. *J Interferon Cytokine Res* 24, 439-454.
- Malmgaard, L., and Paludan, S. R. (2003). Interferon (IFN)-alpha/beta, interleukin (IL)-12 and IL-18 coordinately induce production of IFN-gamma during infection with herpes simplex virus type 2. *J Gen Virol* 84, 2497-2500.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2001). To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* 1, 222-231.
- Mamane, Y., Heylbroeck, C., Genin, P., Algarte, M., Servant, M. J., LePage, C., DeLuca, C., Kwon, H., Lin, R., and Hiscott, J. (1999). Interferon regulatory factors: the next generation. *Gene* 237, 1-14.
- Marie, I., Durbin, J. E., and Levy, D. E. (1998). Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *Embo J* 17, 6660-6669.
- Martin, E., Nathan, C., and Xie, Q. W. (1994). Role of interferon regulatory factor 1 in induction of nitric oxide synthase. *J Exp Med* 180, 977-984.
- Masciullo, V., Sgambato, A., Pacilio, C., Pucci, B., Ferrandina, G., Palazzo, J., Carbone, A., Cittadini, A., Mancuso, S., Scambia, G., and Giordano, A. (1999). Frequent loss of expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 59, 3790-3794.

- Matsuyama, T., Kimura, T., Kitagawa, M., Pfeffer, K., Kawakami, T., Watanabe, N., Kundig, T. M., Amakawa, R., Kishihara, K., Wakeham, A., and et al. (1993). Targeted disruption of IRF-1 or IRF-2 results in abnormal type I IFN gene induction and aberrant lymphocyte development. *Cell* 75, 83-97.
- McAllister, S. S., Becker-Hapak, M., Pintucci, G., Pagano, M., and Dowdy, S. F. (2003). Novel p27(kip1) C-terminal scatter domain mediates Rac-dependent cell migration independent of cell cycle arrest functions. *Mol Cell Biol* 23, 216-228.
- Meraz, M. A., White, J. M., Sheehan, K. C., Bach, E. A., Rodig, S. J., Dighe, A. S., Kaplan, D. H., Riley, J. K., Greenlund, A. C., Campbell, D., et al. (1996). Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell* 84, 431-442.
- Milone, M. C., and Fitzgerald-Bocarsly, P. (1998). The mannose receptor mediates induction of IFN-alpha in peripheral blood dendritic cells by enveloped RNA and DNA viruses. *J Immunol* 161, 2391-2399.
- Miyamoto, M., Fujita, T., Kimura, Y., Maruyama, M., Harada, H., Sudo, Y., Miyata, T., and Taniguchi, T. (1988). Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements. *Cell* 54, 903-913.
- Morgan, D. O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 261-291.
- Murray, A. W. (2004). Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 116, 221-234.
- Musgrove, E. A., Lee, C. S., Buckley, M. F., and Sutherland, R. L. (1994). Cyclin D1 induction in breast cancer cells shortens G1 and is sufficient for cells arrested in G1 to complete the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8022-8026.
- Nehyba, J., Hrdlickova, R., Burnside, J., and Bose, H. R., Jr. (2002). A novel interferon regulatory factor (IRF), IRF-10, has a unique role in immune defense and is induced by the v-Rel oncoprotein. *Mol Cell Biol* 22, 3942-3957.
- Nguyen, H., Lin, R., and Hiscott, J. (1997). Activation of multiple growth regulatory genes following inducible expression of IRF-1 or IRF/RelA fusion proteins. *Oncogene* 15, 1425-1435.
- Nourse, J., Firpo, E., Flanagan, W. M., Coats, S., Polyak, K., Lee, M. H., Massague, J., Crabtree, G. R., and Roberts, J. M. (1994). Interleukin-2-mediated elimination of the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature* 372, 570-573.
- Nozawa, H., Oda, E., Nakao, K., Ishihara, M., Ueda, S., Yokochi, T., Ogasawara, K., Nakatsuru, Y., Shimizu, S., Ohira, Y., et al. (1999). Loss of transcription factor IRF-1 affects tumor susceptibility in mice carrying the Ha-ras transgene or nullizygosity for p53. *Genes Dev* 13, 1240-1245.
- Ogasawara, K., Hida, S., Azimi, N., Tagaya, Y., Sato, T., Yokochi-Fukuda, T., Waldmann, T. A., Taniguchi, T., and Taki, S. (1998). Requirement for IRF-1 in the microenvironment supporting development of natural killer cells. *Nature* 391, 700-703.

- Ogasawara, S., Tamura, G., Maesawa, C., Suzuki, Y., Ishida, K., Satoh, N., Uesugi, N., Saito, K., and Satodate, R. (1996). Common deleted region on the long arm of chromosome 5 in esophageal carcinoma. *Gastroenterology* 110, 52-57.
- Olszewski, M. A., Gray, J., and Vestal, D. J. (2006). In silico genomic analysis of the human and murine guanylate-binding protein (GBP) gene clusters. *J Interferon Cytokine Res* 26, 328-352.
- Onoguchi, K., Yoneyama, M., Takemura, A., Akira, S., Taniguchi, T., Namiki, H., and Fujita, T. (2007). Viral infections activate types I and III interferon genes through a common mechanism. *J Biol Chem* 282, 7576-7581.
- Pagano, M., Pepperkok, R., Verde, F., Ansorge, W., and Draetta, G. (1992). Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *Embo J* 11, 961-971.
- Pagano, M., Tam, S. W., Theodoras, A. M., Beer-Romero, P., Del Sal, G., Chau, V., Yew, P. R., Draetta, G. F., and Rolfe, M. (1995). Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* 269, 682-685.
- Paladino, P., Cummings, D. T., Noyce, R. S., and Mossman, K. L. (2006). The IFN-independent response to virus particle entry provides a first line of antiviral defense that is independent of TLRs and retinoic acid-inducible gene I. *J Immunol* 177, 8008-8016.
- Pavlovic, J., Arzet, H. A., Hefti, H. P., Frese, M., Rost, D., Ernst, B., Kolb, E., Staeheli, P., and Haller, O. (1995). Enhanced virus resistance of transgenic mice expressing the human MxA protein. *J Virol* 69, 4506-4510.
- Pavlovic, J., Haller, O., and Staeheli, P. (1992). Human and mouse Mx proteins inhibit different steps of the influenza virus multiplication cycle. *J Virol* 66, 2564-2569.
- Penninger, J. M., Sirard, C., Mittrucker, H. W., Chidgey, A., Kozieradzki, I., Nghiem, M., Hakem, A., Kimura, T., Timms, E., Boyd, R., *et al.* (1997). The interferon regulatory transcription factor IRF-1 controls positive and negative selection of CD8+ thymocytes. *Immunity* 7, 243-254.
- Pine, R. (1992). Constitutive expression of an ISGF2/IRF1 transgene leads to interferon-independent activation of interferon-inducible genes and resistance to virus infection. *J Virol* 66, 4470-4478.
- Pine, R., Canova, A., and Schindler, C. (1994). Tyrosine phosphorylated p91 binds to a single element in the ISGF2/IRF-1 promoter to mediate induction by IFN alpha and IFN gamma, and is likely to autoregulate the p91 gene. *Embo J* 13, 158-167.
- Pine, R., Decker, T., Kessler, D. S., Levy, D. E., and Darnell, J. E., Jr. (1990). Purification and cloning of interferon-stimulated gene factor 2 (ISGF2): ISGF2 (IRF-1) can bind to the promoters of both beta interferon- and interferon-stimulated genes but is not a primary transcriptional activator of either. *Mol Cell Biol* 10, 2448-2457.
- Pizzoferrato, E., Liu, Y., Gambotto, A., Armstrong, M. J., Stang, M. T., Gooding, W. E., Alber, S. M., Shand, S. H., Watkins, S. C., Storkus, W. J., and Yim, J. H. (2004). Ectopic expression of interferon regulatory factor-1 promotes human breast cancer cell death and results in reduced expression of survivin. *Cancer Res* 64, 8381-8388.

- Rajagopalan, S., Fu, J., and Long, E. O. (2001). Cutting edge: induction of IFN-gamma production but not cytotoxicity by the killer cell Ig-like receptor KIR2DL4 (CD158d) in resting NK cells. *J Immunol* 167, 1877-1881.
- Ramsauer, K., Farlik, M., Zupkovitz, G., Seiser, C., Kröger, A., Hauser, H., and Decker, T. (2007). Distinct modes of action applied by transcription factors STAT1 and IRF1 to initiate transcription of the IFN- $\gamma$ -inducible gbp2 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Reis, L. F., Harada, H., Wolchok, J. D., Taniguchi, T., and Vilcek, J. (1992). Critical role of a common transcription factor, IRF-1, in the regulation of IFN-beta and IFN-inducible genes. *Embo J* 11, 185-193.
- Reynisdottir, I., Polyak, K., Iavarone, A., and Massague, J. (1995). Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev* 9, 1831-1845.
- Rivieccio, M. A., Suh, H. S., Zhao, Y., Zhao, M. L., Chin, K. C., Lee, S. C., and Brosnan, C. F. (2006). TLR3 Ligation Activates an Antiviral Response in Human Fetal Astrocytes: A Role for Viperin/cig5. *J Immunol* 177, 4735-4741.
- Roberts, W. K., Hovanessian, A., Brown, R. E., Clemens, M. J., and Kerr, I. M. (1976). Interferon-mediated protein kinase and low-molecular-weight inhibitor of protein synthesis. *Nature* 264, 477-480.
- Robles, A. I., Larcher, F., Whalin, R. B., Murillas, R., Richie, E., Gimenez-Conti, I. B., Jorcano, J. L., and Conti, C. J. (1996). Expression of cyclin D1 in epithelial tissues of transgenic mice results in epidermal hyperproliferation and severe thymic hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7634-7638.
- Roger, T., Out, T., Mukaida, N., Matsushima, K., Jansen, H., and Lutter, R. (1998). Enhanced AP-1 and NF-kappaB activities and stability of interleukin 8 (IL-8) transcripts are implicated in IL-8 mRNA superinduction in lung epithelial H292 cells. *Biochem J* 330 ( Pt 1), 429-435.
- Russo, A. A., Jeffrey, P. D., Patten, A. K., Massague, J., and Pavletich, N. P. (1996). Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature* 382, 325-331.
- Saeed, A. I., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., Braisted, J., Klapa, M., Currier, T., Thiagarajan, M., *et al.* (2003). TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* 34, 374-378.
- Salkowski, C. A., Kopydlowski, K., Blanco, J., Cody, M. J., McNally, R., and Vogel, S. N. (1999). IL-12 is dysregulated in macrophages from IRF-1 and IRF-2 knockout mice. *J Immunol* 163, 1529-1536.
- Salkowski, C. A., Thomas, K. E., Cody, M. J., and Vogel, S. N. (2000). Impaired IFN-gamma production in IFN regulatory factor-1 knockout mice during endotoxemia is secondary to a loss of both IL-12 and IL-12 receptor expression. *J Immunol* 165, 3970-3977.
- Sareneva, T., Matikainen, S., Kurimoto, M., and Julkunen, I. (1998). Influenza A virus-induced IFN-alpha/beta and IL-18 synergistically enhance IFN-gamma gene expression in human T cells. *J Immunol* 160, 6032-6038.



- Sato, M., Hata, N., Asagiri, M., Nakaya, T., Taniguchi, T., and Tanaka, N. (1998). Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7. *FEBS Lett* 441, 106-110.
- Sato, M., Suemori, H., Hata, N., Asagiri, M., Ogasawara, K., Nakao, K., Nakaya, T., Katsuki, M., Noguchi, S., Tanaka, N., and Taniguchi, T. (2000). Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN- $\alpha$ /beta gene induction. *Immunity* 13, 539-548.
- Scherr, M., Battmer, K., Ganser, A., and Eder, M. (2003). Modulation of gene expression by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA. *Cell Cycle* 2, 251-257.
- Schmitz, F., Heit, A., Guggemoos, S., Krug, A., Mages, J., Schiemann, M., Adler, H., Drexler, I., Haas, T., Lang, R., and Wagner, H. (2007). Interferon-regulatory-factor 1 controls Toll-like receptor 9-mediated IFN-beta production in myeloid dendritic cells. *Eur J Immunol* 37, 315-327.
- Schwarz, D. A., Katayama, C. D., and Hedrick, S. M. (1998). Schlafen, a new family of growth regulatory genes that affect thymocyte development. *Immunity* 9, 657-668.
- Seoane, J., Le, H. V., and Massague, J. (2002). Myc suppression of the p21(Cip1) Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature* 419, 729-734.
- Severa, M., Coccia, E. M., and Fitzgerald, K. A. (2006). Toll-like receptor-dependent and -independent Viperin gene expression and counter-regulation by PRD-I-binding factor-1/BLIMP-1. *J Biol Chem*.
- Sharpless, N. E., Bardeesy, N., Lee, K. H., Carrasco, D., Castrillon, D. H., Aguirre, A. J., Wu, E. A., Horner, J. W., and DePinho, R. A. (2001). Loss of p16Ink4a with retention of p19Arf predisposes mice to tumorigenesis. *Nature* 413, 86-91.
- Sheppard, P., Kindsvogel, W., Xu, W., Henderson, K., Schlutsmeyer, S., Whitmore, T. E., Kuestner, R., Garrigues, U., Birks, C., Roraback, J., *et al.* (2003). IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol* 4, 63-68.
- Sherr, C. J. (1996). Cancer cell cycles. *Science* 274, 1672-1677.
- Sherr, C. J. (2004). Principles of tumor suppression. *Cell* 116, 235-246.
- Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (2004). Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 18, 2699-2711.
- Shin, I., Yakes, F. M., Rojo, F., Shin, N. Y., Bakin, A. V., Baselga, J., and Arteaga, C. L. (2002). PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med* 8, 1145-1152.
- Sicinski, P., Donaher, J. L., Parker, S. B., Li, T., Fazeli, A., Gardner, H., Haslam, S. Z., Bronson, R. T., Elledge, S. J., and Weinberg, R. A. (1995). Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. *Cell* 82, 621-630.
- Singh, S. P., Lipman, J., Goldman, H., Ellis, F. H., Jr., Aizenman, L., Cangi, M. G., Signoretti, S., Chiaur, D. S., Pagano, M., and Loda, M. (1998). Loss or altered subcellular localization of p27 in Barrett's associated adenocarcinoma. *Cancer Res* 58, 1730-1735.

- Siren, J., Pirhonen, J., Julkunen, I., and Matikainen, S. (2005). IFN- $\alpha$  regulates TLR-dependent gene expression of IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL-28, and IL-29. *J Immunol* *174*, 1932-1937.
- Slattery, E., Ghosh, N., Samanta, H., and Lengyel, P. (1979). Interferon, double-stranded RNA, and RNA degradation: activation of an endonuclease by (2'-5')An. *Proc Natl Acad Sci U S A* *76*, 4778-4782.
- Slingerland, J., and Pagano, M. (2000). Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J Cell Physiol* *183*, 10-17.
- Stojdl, D. F., Lichty, B. D., tenOever, B. R., Paterson, J. M., Power, A. T., Knowles, S., Marius, R., Reynard, J., Poliquin, L., Atkins, H., *et al.* (2003). VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell* *4*, 263-275.
- Sun, B. J., and Nie, P. (2004). Molecular cloning of the viperin gene and its promoter region from the mandarin fish *Siniperca chuatsi*. *Vet Immunol Immunopathol* *101*, 161-170.
- Taki, S., Sato, T., Ogasawara, K., Fukuda, T., Sato, M., Hida, S., Suzuki, G., Mitsuyama, M., Shin, E. H., Kojima, S., *et al.* (1997). Multistage regulation of Th1-type immune responses by the transcription factor IRF-1. *Immunity* *6*, 673-679.
- Tamura, G., Ogasawara, S., Nishizuka, S., Sakata, K., Maesawa, C., Suzuki, Y., Terashima, M., Saito, K., and Satodate, R. (1996). Two distinct regions of deletion on the long arm of chromosome 5 in differentiated adenocarcinomas of the stomach. *Cancer Res* *56*, 612-615.
- Tan, R. S., Taniguchi, T., and Harada, H. (1996). Identification of the lysyl oxidase gene as target of the antioncogenic transcription factor, IRF-1, and its possible role in tumor suppression. *Cancer Res* *56*, 2417-2421.
- Tanaka, N., Ishihara, M., Kitagawa, M., Harada, H., Kimura, T., Matsuyama, T., Lamphier, M. S., Aizawa, S., Mak, T. W., and Taniguchi, T. (1994a). Cellular commitment to oncogene-induced transformation or apoptosis is dependent on the transcription factor IRF-1. *Cell* *77*, 829-839.
- Tanaka, N., Ishihara, M., Lamphier, M. S., Nozawa, H., Matsuyama, T., Mak, T. W., Aizawa, S., Tokino, T., Oren, M., and Taniguchi, T. (1996). Cooperation of the tumour suppressors IRF-1 and p53 in response to DNA damage. *Nature* *382*, 816-818.
- Tanaka, N., Ishihara, M., and Taniguchi, T. (1994b). Suppression of c-myc or fosB-induced cell transformation by the transcription factor IRF-1. *Cancer Lett* *83*, 191-196.
- Tanaka, N., Kawakami, T., and Taniguchi, T. (1993). Recognition DNA sequences of interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2, regulators of cell growth and the interferon system. *Mol Cell Biol* *13*, 4531-4538.
- Tanaka, N., and Taniguchi, T. (2000). The interferon regulatory factors and oncogenesis. *Semin Cancer Biol* *10*, 73-81.
- Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, A., and Tanaka, N. (2001). IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol* *19*, 623-655.

- Tavazoie, S., Hughes, J. D., Campbell, M. J., Cho, R. J., and Church, G. M. (1999). Systematic determination of genetic network architecture. *Nat Genet* 22, 281-285.
- Ten, R. M., Blank, V., Le Bail, O., Kourilsky, P., and Israel, A. (1993). Two factors, IRF1 and KBF1/NF-kappa B, cooperate during induction of MHC class I gene expression by interferon alpha beta or Newcastle disease virus. *C R Acad Sci III* 316, 496-501.
- Tomkins, G. M., Thompson, E. B., Hayashi, S., Gelehrter, T., Granner, D., and Peterkofsky, B. (1966). Tyrosine transaminase induction in mammalian cells in tissue culture. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 31, 349-360.
- Trinchieri, G., Pflanz, S., and Kastelein, R. A. (2003). The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity* 19, 641-644.
- Ungermannova, D., Gao, Y., and Liu, X. (2005). Ubiquitination of p27Kip1 requires physical interaction with cyclin E and probable phosphate recognition by SKP2. *J Biol Chem* 280, 30301-30309.
- van den Heuvel, S., and Harlow, E. (1993). Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. *Science* 262, 2050-2054.
- Veckman, V., Osterlund, P., Fagerlund, R., Melen, K., Matikainen, S., and Julkunen, I. (2006). TNF-alpha and IFN-alpha enhance influenza-A-virus-induced chemokine gene expression in human A549 lung epithelial cells. *Virology* 345, 96-104.
- Viglietto, G., Motti, M. L., Bruni, P., Melillo, R. M., D'Alessio, A., Califano, D., Vinci, F., Chiappetta, G., Tschlis, P., Bellacosa, A., *et al.* (2002a). Cytoplasmic relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nat Med* 8, 1136-1144.
- Viglietto, G., Motti, M. L., and Fusco, A. (2002b). Understanding p27(kip1) deregulation in cancer: down-regulation or mislocalization. *Cell Cycle* 1, 394-400.
- Vlach, J., Hennecke, S., and Amati, B. (1997). Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Embo J* 16, 5334-5344.
- Wang, T. C., Cardiff, R. D., Zukerberg, L., Lees, E., Arnold, A., and Schmidt, E. V. (1994). Mammary hyperplasia and carcinoma in MMTV-cyclin D1 transgenic mice. *Nature* 369, 669-671.
- Watanabe, N., Sakakibara, J., Hovanessian, A. G., Taniguchi, T., and Fujita, T. (1991). Activation of IFN-beta element by IRF-1 requires a posttranslational event in addition to IRF-1 synthesis. *Nucleic Acids Res* 19, 4421-4428.
- Wathelet, M. G., Lin, C. H., Parekh, B. S., Ronco, L. V., Howley, P. M., and Maniatis, T. (1998). Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN-beta enhancer in vivo. *Mol Cell* 1, 507-518.
- Weinert, T. (1997). Yeast checkpoint controls and relevance to cancer. *Cancer Surv* 29, 109-132.

- Westwick, J. K., Lambert, Q. T., Clark, G. J., Symons, M., Van Aelst, L., Pestell, R. G., and Der, C. J. (1997). Rac regulation of transformation, gene expression, and actin organization by multiple, PAK-independent pathways. *Mol Cell Biol* 17, 1324-1335.
- White, L. C., Wright, K. L., Felix, N. J., Ruffner, H., Reis, L. F., Pine, R., and Ting, J. P. (1996). Regulation of LMP2 and TAP1 genes by IRF-1 explains the paucity of CD8+ T cells in IRF-1<sup>-/-</sup> mice. *Immunity* 5, 365-376.
- Willman, C. L., Sever, C. E., Pallavicini, M. G., Harada, H., Tanaka, N., Slovak, M. L., Yamamoto, H., Harada, K., Meeker, T. C., List, A. F., and et al. (1993). Deletion of IRF-1, mapping to chromosome 5q31.1, in human leukemia and preleukemic myelodysplasia. *Science* 259, 968-971.
- Wolf, G., Jablonski, K., Schroeder, R., Reinking, R., Shankland, S. J., and Stahl, R. A. (2003). Angiotensin II-induced hypertrophy of proximal tubular cells requires p27Kip1. *Kidney Int* 64, 71-81.
- Xie, R. L., Gupta, S., Miele, A., Shiffman, D., Stein, J. L., Stein, G. S., and van Wijnen, A. J. (2003). The tumor suppressor interferon regulatory factor 1 interferes with SP1 activation to repress the human CDK2 promoter. *J Biol Chem* 278, 26589-26596.
- Xiong, Y., Hannon, G. J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., and Beach, D. (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366, 701-704.
- Yamada, G., Ogawa, M., Akagi, K., Miyamoto, H., Nakano, N., Itoh, S., Miyazaki, J., Nishikawa, S., Yamamura, K., and Taniguchi, T. (1991). Specific depletion of the B-cell population induced by aberrant expression of human interferon regulatory factor 1 gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 532-536.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., and Akira, S. (2003). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301, 640-643.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., and Fujita, T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 5, 730-737.
- Zaragoza, C., Ocampo, C. J., Saura, M., McMillan, A., and Lowenstein, C. J. (1997). Nitric oxide inhibition of coxsackievirus replication in vitro. *J Clin Invest* 100, 1760-1767.
- Zhong, S., Storch, K. F., Lipan, O., Kao, M. C., Weitz, C. J., and Wong, W. H. (2004). GoSurfer: a graphical interactive tool for comparative analysis of large gene sets in Gene Ontology space. *Appl Bioinformatics* 3, 261-264.
- Zhou, A., Paranjape, J. M., Der, S. D., Williams, B. R., and Silverman, R. H. (1999). Interferon action in triply deficient mice reveals the existence of alternative antiviral pathways. *Virology* 258, 435-440.
- Zilberstein, A., Federman, P., Shulman, L., and Revel, M. (1976). Specific phosphorylation in vitro of a protein associated with ribosomes of interferon-treated mouse L cells. *FEBS Lett* 68, 119-124.

## 7. Anhang

Tabelle 1: Durch c-myc/c-H-ras differentiell regulierte Gene

ProbeSetID	Gen Symbol	Signalstärke (Mittelwert aus Exp.1 und Exp.2)		
		+Dox	-Dox	-Dox +48h E2
162440_r_at	---	886.96	1376.22	1008.67
161973_r_at	---	23.55	50.00	53.70
161874_r_at	---	66.42	21.40	54.03
161272_f_at	---	22.47	60.47	40.43
161131_r_at	---	68.51	151.98	128.11
160906_i_at	---	6.53	54.45	19.07
160768_at	---	66.81	157.43	94.41
160519_at	---	961.58	325.09	801.60
160366_at	---	376.86	210.10	337.23
160328_at	---	272.59	514.08	348.20
160297_at	---	117.88	238.96	110.27
160273_at	---	1893.79	1068.07	1483.00
160261_i_at	---	355.41	180.58	293.61
160148_at	---	54.81	31.20	36.02
104458_at	---	398.76	215.24	284.33
104252_at	---	135.46	407.42	423.59
103629_g_at	---	37.57	17.77	41.98
103628_at	---	107.79	187.15	207.99
103574_at	---	77.68	32.99	119.68
103204_r_at	---	33.24	83.97	12.31
103203_f_at	---	12.95	54.54	11.91
102965_at	---	116.65	57.29	617.05
102784_at	---	230.54	93.10	362.21
102558_at	---	21.59	7.91	30.78
102348_at	---	592.92	111.20	304.21
102225_at	---	41.35	13.10	47.18
102140_at	---	7.64	40.20	25.75
102106_at	---	8.33	37.31	37.51
102003_at	---	439.15	244.34	399.17
101350_g_at	---	233.70	564.28	196.13
100482_at	---	258.59	449.73	366.47
100465_i_at	---	280.02	160.73	143.16
100348_at	---	20.77	49.33	21.25
100338_s_at	---	34.89	17.22	54.08
100138_f_at	---	109.75	274.23	100.44
99926_at	---	100.92	63.28	111.35
99866_at	---	50.29	24.07	45.34
99830_at	---	40.59	7.32	28.55
99429_at	---	19.18	45.25	18.73
99360_at	---	41.71	16.95	17.65
99108_s_at	---	464.00	150.16	354.52
99058_at	---	394.38	708.32	296.40
98524_f_at	---	60.81	281.04	79.34
98247_at	---	38.47	6.48	9.47
98049_at	---	254.19	151.80	401.78
97565_r_at	---	23.19	53.27	24.56
97406_at	---	149.28	73.94	105.49
96765_at	---	362.14	126.69	137.73
96565_at	---	36.19	94.78	40.49
96530_at	---	533.30	234.77	374.70
96138_at	---	215.61	398.89	281.59
95912_at	---	29.67	75.53	50.05
95587_at	---	269.19	166.01	284.90
95378_at	---	67.79	30.77	68.97
95377_at	---	41.77	23.22	20.44
95312_at	---	50.95	22.92	71.72

94991_at	---	257.63	51.32	80.86
94805_f_at	---	2800.65	7350.19	1259.96
94784_at	---	114.03	194.27	92.76
94477_at	---	155.25	76.56	135.49
94111_r_at	---	53.00	107.37	59.22
93707_f_at	---	36.20	60.78	69.36
93572_at	---	471.78	818.99	478.62
93451_at	---	251.38	94.79	127.79
93180_at	---	100.06	387.03	129.50
93145_at	---	32.99	59.01	31.39
93130_at	---	79.77	163.33	127.33
93068_r_at	---	925.76	171.40	821.27
93067_f_at	---	668.99	230.37	833.05
92923_g_at	---	30.87	12.88	16.19
92773_at	---	90.52	42.06	99.32
92205_at	---	185.99	99.66	123.32
96337_at	05-Sep	244.03	139.25	164.38
96017_at	0610006I08Rik	9.93	57.18	16.17
160271_at	0610007C21Rik	551.52	303.66	421.64
97835_at	0610007L05Rik	69.34	26.35	61.99
96653_at	0610007O07Rik	715.38	473.00	927.13
95677_at	0610009C03Rik	178.30	447.06	172.09
96605_at	0610011I04Rik	827.11	348.42	479.73
160231_at	0610012A19Rik	179.22	376.51	165.26
98615_at	0610041E09Rik	491.56	306.09	375.87
96615_at	0610043B10Rik	623.78	258.68	625.17
99618_at	0710008D09Rik	1098.84	1892.87	1241.03
97907_at	0910001B06Rik	514.85	1033.20	371.60
94455_at	1010001J12Rik	178.30	325.50	108.59
96321_at	1010001N11Rik	727.87	1218.24	781.62
101912_at	1100001G20Rik	47.33	13.86	13.61
94908_r_at	1110001J03Rik	193.14	316.83	222.34
94907_f_at	1110001J03Rik	565.23	997.23	651.78
95477_at	1110001M20Rik	607.24	341.46	538.99
160240_at	1110003E01Rik	588.94	324.77	700.80
96662_at	1110003O22Rik	551.25	72.97	161.86
95657_f_at	1110004G16Rik	124.89	314.66	103.22
95656_i_at	1110004G16Rik	78.18	190.53	71.14
95497_at	1110005A05Rik	9.34	75.48	8.12
96756_at	1110007M04Rik	26.82	56.13	35.18
95409_at	1110019J04Rik	333.46	821.45	342.90
162269_at	1110020E07Rik	33.06	51.21	31.14
97919_at	1110021E09Rik	74.01	127.41	109.24
99445_at	1110028E10Rik	160.72	59.18	128.32
160376_at	1110029F20Rik	532.52	136.48	401.84
160596_at	1110030J09Rik	61.94	98.49	72.14
98057_at	1110031E24Rik	123.22	47.73	75.84
103092_at	1110032A10Rik	58.94	111.66	48.67
96604_at	1110032N12Rik	136.89	270.77	155.14
103404_at	1110033A15Rik	673.51	441.66	577.77
99078_at	1110033C18Rik	201.20	402.89	226.19
97250_at	1110036B12Rik	1078.27	2235.82	1512.92
96784_at	1110037A17Rik	269.30	605.25	280.25
97527_at	1110038L14Rik	218.84	730.55	162.93
104491_at	1110054G21Rik	29.51	57.22	27.87
92941_at	1110054M08Rik	66.91	27.92	69.14
160387_at	1110055L24Rik	52.12	32.88	35.25
98904_at	1110066C01Rik	153.03	265.56	176.47
160359_at	1190002H23Rik	33.90	6.40	47.15
92817_at	1190002L16Rik	668.28	1418.45	879.14
98594_at	1190002N15Rik	51.93	112.78	40.44
162370_r_at	1190005L06Rik	41.08	93.03	64.29

98089_at	1190005P17Rik	15.07	48.63	28.70
95418_at	1190017B18Rik	174.46	34.69	103.16
96708_at	1200002G13Rik	632.01	377.91	563.90
160302_at	1200003C05Rik	455.87	268.69	336.37
95885_at	1200009F10Rik	154.12	83.82	114.29
95357_at	1200009I24Rik	46.51	80.14	47.90
96725_at	1200010B10Rik	591.83	307.53	468.68
100974_at	1210002E11Rik	131.17	231.05	129.16
96890_at	1300002A08Rik	247.98	116.64	242.22
102279_at	1300004C08Rik	73.21	39.09	392.19
93327_at	1300011C24Rik	382.31	148.29	273.81
160337_at	1300017C10Rik	287.21	564.59	247.55
162417_at	1500001M20Rik	23.84	59.99	33.93
160723_at	1500001M20Rik	56.84	115.26	47.03
160111_at	1500010B24Rik	85.79	180.72	57.55
93358_at	1500010B24Rik	326.95	583.37	328.89
98610_at	1500012D08Rik	107.93	179.84	142.95
98938_at	1500026D16Rik	205.96	457.55	148.90
161949_at	1500035H01Rik	32.12	76.75	27.78
97423_at	1500035H01Rik	238.15	144.26	153.55
100297_at	1600024A01Rik	120.17	72.77	89.66
97364_at	1700003K02Rik	50.08	156.89	34.20
98890_at	1700012G19Rik	36.72	91.15	35.72
98077_at	1700043E15Rik	103.75	232.66	81.57
97798_at	1810005H09Rik	186.43	118.65	202.29
95137_at	1810014L12Rik	374.30	941.14	222.00
160339_at	1810018M05Rik	207.01	375.19	155.23
103540_at	1810021B22Rik	34.35	10.05	56.24
94260_at	1810024J12Rik	614.11	1052.70	898.18
103381_at	1810024J13Rik	881.09	504.74	872.88
95146_at	1810045K07Rik	818.01	500.05	882.37
93462_at	1810054D07Rik	15.23	25.60	43.50
100877_at	1810058I24Rik	1074.32	585.19	744.34
104279_at	1810060D16Rik	805.31	1482.43	737.93
160208_at	1810061H24Rik	275.50	457.61	306.50
160414_at	1810073N04Rik	759.77	479.90	604.63
102409_at	2010003I05Rik	138.09	263.11	132.74
102331_at	2010004M01Rik	162.62	86.02	100.78
94417_at	2010008E23Rik	72.54	36.32	68.19
100013_at	2010008K16Rik	127.33	214.57	858.96
103310_at	2010009J12Rik	46.74	24.22	7.81
96231_at	2010012D11Rik	107.30	41.51	86.41
93853_at	2010306G19Rik	72.60	41.65	66.78
160955_at	2010309E21Rik	73.14	249.18	92.39
160444_at	2010319C14Rik	360.80	211.49	288.15
101384_at	2210008A03Rik	49.03	15.30	16.49
160398_at	2210008F15Rik	36.51	64.37	36.58
93187_at	2210023F24Rik	379.85	638.65	503.81
104000_at	2210023G05Rik	139.82	404.72	165.71
103560_at	2210402C18Rik	74.12	123.22	65.05
93877_at	2210419D22Rik	609.11	225.00	403.63
160217_at	2310001A20Rik	63.10	22.35	76.35
160434_at	2310004K06Rik	219.20	133.69	187.91
160492_at	2310005B10Rik	244.54	422.99	290.61
100037_at	2310005B10Rik	178.12	350.61	187.83
96122_at	2310016A09Rik	47.48	82.62	71.29
95063_at	2310021G01Rik	63.65	271.27	48.73
97371_at	2310022K01Rik	48.36	81.76	28.54
96261_at	2310028O11Rik	367.69	702.67	436.52
98941_r_at	2310032D16Rik	91.02	53.45	61.93
92703_at	2310032M22Rik	239.33	139.98	169.51
160793_at	2310038G18Rik	126.30	61.79	150.42

104695_at	2310040C09Rik	16.41	41.82	29.78
96871_at	2310042G06Rik	124.84	234.40	102.22
95109_at	2310044F10Rik	251.73	942.82	284.49
104761_at	2310046B19Rik	361.95	152.07	235.02
94238_at	2310046G15Rik	307.35	75.75	140.25
93530_at	2310047C21Rik	53.00	27.62	42.78
93529_at	2310047C21Rik	144.38	82.06	171.58
97403_at	2310050B20Rik	216.74	417.07	213.80
160218_at	2310056P07Rik	320.14	611.20	336.39
160067_at	2310057D15Rik	64.55	130.62	74.33
160461_f_at	2310057H16Rik	610.92	1264.94	307.25
98914_at	2310079C17Rik	457.73	694.04	347.10
101485_at	2400003O03Rik	757.45	1230.90	722.39
96106_at	2400006P09Rik	52.44	103.33	47.77
93986_at	2410003A14Rik	131.17	224.30	128.53
97891_at	2410004C24Rik	103.65	253.89	93.06
160283_at	2410005K20Rik	713.75	1786.48	740.63
160230_at	2410008J01Rik	581.22	1075.55	1195.52
96827_at	2410008J01Rik	148.39	337.52	128.68
96294_s_at	2410015N17Rik	80.30	167.95	52.44
96293_at	2410015N17Rik	116.05	407.96	53.06
96200_at	2410018C03Rik	308.52	591.41	282.11
98921_at	2410018G23Rik	240.72	149.85	219.42
103553_at	2410041F14Rik	33.80	71.98	32.68
97896_r_at	2410071B14Rik	45.30	99.73	32.12
97895_f_at	2410071B14Rik	224.61	706.94	195.15
96677_at	2410195B05Rik	232.15	543.86	252.66
98440_at	2510002C21Rik	444.19	235.53	209.54
160491_at	2510010F15Rik	38.76	69.20	66.98
96885_at	2510015F01Rik	177.76	338.27	103.50
160845_at	2600001J17Rik	84.01	193.55	69.91
104693_at	2600001M11Rik	11.60	59.25	9.09
98552_at	2600009M07Rik	58.30	277.80	67.20
100890_at	2600017H24Rik	90.35	214.01	105.76
161122_f_at	2610003B19Rik	230.90	383.34	211.41
96909_at	2610003B19Rik	351.26	784.31	509.57
160445_at	2610005H11Rik	612.18	390.88	371.12
162424_f_at	2610007K22Rik	254.06	152.71	230.44
97252_at	2610012O22Rik	98.47	241.99	102.59
92421_at	2610014F08Rik	52.73	23.68	41.31
98931_at	2610016K11Rik	585.26	276.30	681.87
97349_at	2610019M19Rik	290.49	128.58	170.78
104045_at	2610102M01Rik	135.59	49.39	101.57
161000_i_at	2610201A12Rik	61.35	136.67	43.08
95927_f_at	2610201A13Rik	32.95	67.20	15.62
95058_f_at	2610205H19Rik	248.07	119.45	133.12
97164_at	2610207P08Rik	41.85	92.22	37.61
102368_at	2610208E05Rik	79.88	45.97	71.14
94510_at	2610312E17Rik	231.25	399.88	202.49
160206_at	2610510H01Rik	149.75	335.20	148.46
99182_at	2610511E03Rik	59.20	130.80	55.90
160885_at	2700010L10Rik	428.40	767.65	292.45
103069_at	2700022J23Rik	56.45	91.78	41.94
94081_at	2700027J02Rik	395.99	664.24	345.48
97205_at	2700079K05Rik	120.63	344.85	124.37
100955_at	2700084L22Rik	21.72	58.53	13.28
96016_at	2700094K13Rik	320.11	646.63	279.79
103760_at	2810004N23Rik	70.65	109.99	73.33
160121_at	2810017M24Rik	457.54	288.63	284.37
97374_at	2810025M15Rik	81.81	248.75	77.65
96946_at	2810025O06Rik	101.92	229.32	149.53
104089_at	2810026P18Rik	49.42	85.49	27.07



160134_at	2810031L11Rik	54.71	135.26	63.21
104423_at	2810047L02Rik	58.39	199.17	30.21
95151_at	2810052M02Rik	84.88	30.28	20.24
95150_at	2810052M02Rik	48.23	11.97	7.82
94346_at	2810408K05Rik	79.38	47.81	73.67
100116_at	2810417H13Rik	133.99	260.99	53.41
103071_at	2810429C13Rik	71.95	132.79	38.38
103664_r_at	2810452K22Rik	35.78	69.71	30.56
97703_at	2810470K21Rik	23.29	60.01	21.91
100887_at	2810489L22Rik	44.40	80.07	40.63
99514_at	2900002K07Rik	10.81	67.33	22.48
93581_at	2900010I05Rik	838.18	1336.60	1107.17
100041_at	3010027G13Rik	817.63	1429.93	1032.96
160136_r_at	3100002M17Rik	152.27	86.91	191.23
101507_at	3110001I17Rik	30.87	7.02	43.08
104567_at	3110052F15Rik	46.90	95.58	73.34
104463_at	3830408P06Rik	185.27	350.34	223.09
101998_at	4833420G17Rik	109.83	66.97	78.85
160722_at	4833420N02Rik	57.57	90.51	51.50
92787_at	4833425P12Rik	221.25	360.50	253.01
100547_at	4921506I22Rik	236.71	98.76	99.45
104494_at	4921515A04Rik	113.71	73.49	62.28
96494_at	4930429H24Rik	193.77	92.89	158.89
94923_f_at	4930431L18Rik	486.00	848.90	519.43
103901_at	4930451A13Rik	100.17	62.42	75.29
160289_s_at	4930529O08Rik	312.26	517.89	345.57
104640_f_at	4930553M18Rik	150.85	274.23	195.31
104639_i_at	4930553M18Rik	142.60	390.38	139.71
160632_at	4930557O20Rik	68.52	41.96	33.41
94504_at	4930570C03Rik	241.22	374.14	265.49
95444_at	4930579A11Rik	1676.31	646.10	1863.62
96090_g_at	4931406C07Rik	100.44	45.22	68.85
99138_at	4931417M11Rik	48.99	126.42	58.23
160191_at	4931433E08Rik	134.05	210.69	123.34
97442_at	4933419D20Rik	99.69	48.88	64.82
95655_at	4933440J18Rik	36.38	20.08	33.77
94433_at	5033402L14Rik	1038.36	460.27	794.23
94345_at	5133400A03Rik	835.04	313.81	655.90
160203_at	5330419I01Rik	124.08	243.66	80.98
103343_at	5430432M24Rik	51.78	88.94	66.32
104176_at	5530400K14Rik	146.74	94.34	141.63
104195_at	5730408K05Rik	253.31	475.92	215.72
161005_at	5730420B22Rik	224.95	64.69	157.03
102813_f_at	5730525G14Rik	184.80	112.62	171.42
100290_f_at	6230416J20Rik	51.62	96.21	30.62
99777_s_at	6230416J20Rik	19.51	43.73	13.82
94415_at	6230421P05Rik	186.77	86.39	141.15
97967_at	6230425C21Rik	174.89	105.44	125.58
103056_at	6230425C22Rik	104.75	217.08	113.01
103198_at	6330512M04Rik	73.26	35.74	53.73
104435_at	6530405F15Rik	874.64	128.24	379.74
103308_at	6720403H11	23.06	70.86	28.06
94211_at	6720460F02Rik	125.20	206.06	79.99
93624_at	8430417G17Rik	67.08	34.63	63.83
103916_at	8430420C20Rik	58.54	28.66	49.48
161882_f_at	8430425D21Rik	46.72	22.23	12.78
94771_at	9030412M04Rik	176.02	59.68	104.02
162100_r_at	9130410M22Rik	11.22	35.26	17.54
104739_at	9130410M22Rik	206.44	112.82	188.11
97960_at	9330200A01	114.83	52.45	88.69
97360_at	9430096L06Rik	193.86	65.71	97.92
93482_at	9530072E15Rik	754.89	319.13	451.56

94995_at	A030007L17Rik	19.34	39.60	34.43
103697_at	A230075M04Rik	77.27	37.56	51.02
93970_at	A330055O14Rik	68.89	175.62	83.32
162038_f_at	A530057M15Rik	49.07	11.31	31.14
95753_at	A730011O11Rik	48.27	173.62	27.72
95685_at	AA407588	236.90	464.12	205.64
92840_at	AA408140	214.72	408.49	152.07
160973_at	AA408511	52.65	122.09	40.88
160163_at	AA415817	403.44	249.54	324.62
161036_at	AA536730	25.10	114.09	34.10
94460_at	AA617404	513.98	248.66	410.85
96736_at	AA959454	1153.04	624.53	961.64
94486_at	AA959742	914.51	1521.57	1040.92
97198_at	Abca1	27.71	11.49	50.36
93414_at	Abcb1b	14.37	47.23	16.34
103689_at	Abcc3	32.89	67.75	25.78
98969_at	Abcd1	121.41	59.87	285.58
92913_at	Abcd2	109.80	42.35	47.55
102772_at	Abl1	484.01	303.87	330.38
160923_at	Abp1	40.86	69.10	66.22
160482_at	Acaa1	380.95	206.12	440.34
102004_at	Acaa1	90.71	29.31	103.74
101515_at	Acox1	114.35	59.70	108.03
96054_f_at	Acp1	146.16	247.04	111.95
96053_i_at	Acp1	217.40	372.99	222.30
96052_at	Acp1	233.57	612.94	285.57
93100_at	Acta2	619.43	106.76	186.33
162164_f_at	Actn3	16.98	45.84	39.52
93460_at	Acvr1	59.30	29.70	45.97
103554_at	Adam19	318.05	87.95	98.87
92357_at	Adam23	369.99	155.24	174.35
102798_at	Adm	352.18	89.55	249.31
101957_f_at	Adprt1	81.95	216.82	80.76
99804_at	Adra2c	24.90	41.74	33.66
98999_at	Adsl	263.00	589.47	313.77
100412_g_at	Aebp1	2070.67	898.18	1426.73
102907_at	AF506821	836.31	163.97	312.90
101494_at	Afp	19.06	45.45	39.80
101887_at	Agt	313.32	68.66	404.00
96025_g_at	Ahcy	363.64	1120.98	254.39
96024_at	Ahcy	238.88	792.67	201.43
104066_at	AI115348	115.19	65.76	56.82
104464_s_at	AI173274	221.98	108.41	106.60
93144_at	AI317237	333.94	178.32	351.00
93752_at	AI327140	371.04	697.63	427.03
99924_at	AI451582	93.78	323.42	73.11
92589_at	AI480570	187.43	561.70	285.35
103853_at	AI504353	53.12	181.35	68.93
160997_at	AI606951	84.47	169.88	69.57
96833_at	AI647518	143.80	302.39	94.42
104148_at	AI785303	672.64	409.79	703.06
102702_at	AI841487	88.64	50.68	96.99
160947_at	AI851258	44.52	11.80	39.75
95148_at	Ak2	225.35	478.79	233.81
99959_at	Ak4	36.59	180.40	56.77
99521_at	Ak4	51.21	133.64	54.42
101435_at	Akap2	95.96	41.40	68.32
92796_at	Akp2	34.69	12.56	31.15
103068_at	Akr1e1	34.95	22.29	17.94
99471_at	AL022671	112.52	189.44	113.29
161223_r_at	AL024016	46.21	29.05	46.39
95637_at	AL024016	818.76	387.40	738.42

93500_at	Alas1	419.71	225.35	330.08
96058_s_at	Aldh2	142.94	221.84	214.57
96057_at	Aldh2	162.45	263.66	175.09
101489_at	Amd1	481.95	812.42	413.30
160131_at	Amotl2	768.85	141.63	510.08
96118_at	Angptl4	29.23	11.59	34.22
98477_s_at	Ank3	169.87	90.48	65.83
104390_at	Anp32a	138.60	267.91	107.76
93372_at	Anp32a	44.81	84.99	19.04
96891_at	Anp32b	746.25	1973.41	658.74
94304_at	Anxa6	920.28	267.65	513.50
102327_at	Aoc3	252.81	54.12	101.94
160734_at	Ap3s1	828.59	366.95	286.04
160903_at	Apbb2	337.21	129.26	292.28
92744_at	Apc2	78.40	25.61	66.35
101997_at	Apg12l	810.89	269.17	385.10
93498_s_at	Aplp2	990.49	479.29	1055.21
95728_g_at	Apoa5	37.09	76.88	62.77
93592_at	Apod	33.40	5.91	461.48
93063_at	App	2633.55	1457.01	3476.88
100575_at	Ard1	82.48	228.21	81.58
104179_at	Arf6	103.21	41.91	56.30
104697_at	Arhj	143.55	93.97	67.29
162011_f_at	Arhu	226.00	82.10	183.24
96747_at	Arhu	443.16	184.23	241.63
160371_at	Arl6ip	29.32	15.84	25.73
95136_at	Arl6ip4	288.74	452.31	285.69
100931_at	Arsa	504.18	235.53	408.74
161221_f_at	Asns	28.70	60.10	48.87
104156_r_at	Atf3	66.13	36.50	30.48
101180_at	Atm	86.80	176.03	193.58
160960_at	Atp6v0a2	137.21	73.60	107.67
102273_at	Atp6v0a2	143.34	88.61	104.62
92603_at	Atp6v0d1	996.79	469.17	724.26
94301_at	Atp6v0e	1136.69	660.08	954.69
160609_at	Atp7a	314.65	153.90	311.09
102854_s_at	Atp7a	197.48	65.57	166.45
97853_at	AU015605	54.09	109.90	42.87
103418_at	AU040575	76.42	147.42	42.51
160611_at	AW111961	49.10	19.71	62.64
99159_at	AW457192	92.94	205.43	83.91
103630_at	AW536573	291.60	525.23	394.67
102412_at	AW541137	242.20	381.48	184.66
98960_s_at	B3galt3	189.50	92.12	108.63
100539_at	Bach-pending	207.62	352.98	201.22
95659_at	Baf53a-pending	164.93	266.99	176.01
161129_r_at	Bag2	484.59	948.04	441.63
160962_at	Bag2	296.72	771.88	305.80
162321_f_at	Barx1	15.81	35.56	30.99
95674_r_at	Baspl	2205.24	1356.54	1808.07
95673_s_at	Baspl	2772.85	1529.81	1666.43
93536_at	Bax	472.19	924.12	427.67
92381_at	Baz1b	156.77	261.61	230.28
162005_at	BC002318	44.51	75.42	64.63
95517_i_at	BC004004	672.30	423.01	585.62
93980_at	BC019943	29.02	54.84	35.98
161698_f_at	BC019977	529.58	334.87	427.71
104643_at	BC037006	111.88	238.74	139.57
96518_at	BC037006	36.86	92.22	39.33
98948_at	BC037996	74.18	128.06	74.30
98545_at	Bcap37	458.10	834.55	422.55
102302_at	Bckdhh	132.58	218.74	134.41

100988_at	Bcl2l1	321.16	164.45	211.07
97490_at	Bcl7b	67.50	38.49	50.91
101105_at	Bcrp1-pending	1017.55	2228.34	1275.68
102727_at	Bdnf	419.12	204.62	442.81
102734_at	Birc3	96.39	49.63	103.51
101521_at	Birc5	89.20	231.74	55.32
93371_at	Bnc	64.52	34.30	24.02
160878_at	Bop1	106.36	398.98	138.13
102976_at	Brca1	39.81	101.66	35.15
102911_at	Brca2	54.56	120.04	27.05
93104_at	Btg1	626.56	270.90	592.73
104097_at	Bub1	45.58	124.68	12.47
92878_at	Bup	53.16	23.81	24.33
95462_at	Bzw2	443.43	979.30	249.21
103511_at	C030017C09Rik	34.01	110.64	40.43
92526_f_at	C030048H19Rik	114.14	39.10	67.53
92525_i_at	C030048H19Rik	221.75	51.73	133.66
95415_f_at	C1r	449.99	234.71	751.13
96825_at	C1-ten	142.91	80.63	254.53
102917_at	C2ta	18.54	32.74	109.10
93497_at	C3	476.04	117.99	560.42
95604_at	C330006A16Rik	172.48	292.71	263.21
104651_at	C330035N22Rik	89.19	45.50	85.41
103033_at	C4	246.77	55.80	685.47
97710_f_at	C530046L02Rik	45.81	23.11	35.17
104399_at	C630034J23Rik	118.08	224.59	88.44
101906_at	C79747	244.60	429.49	198.40
93741_at	C87860	109.78	169.28	95.72
92445_at	Cacna1a	50.94	17.88	34.17
98483_at	Cacnb3	617.42	302.98	515.37
92596_at	Cacybp	98.00	209.43	122.85
102632_at	Calmbp1	26.29	85.41	20.02
100453_at	Camk2b	5.42	44.22	23.86
93721_at	Cap1	337.04	189.37	357.56
102316_at	Capn5	128.13	73.29	220.49
97943_at	Capn6	317.15	131.14	190.35
97942_g_at	Capn6	550.49	140.05	206.89
99169_at	Carm1-pending	288.80	516.75	257.09
102248_f_at	Cask	502.68	226.16	637.50
161263_f_at	Casp2	68.72	40.63	61.92
98436_s_at	Casp3	129.42	280.39	98.14
102905_at	Casp4	74.51	35.92	75.96
94458_at	Casp6	75.69	44.58	51.86
98498_at	Casp7	88.63	139.99	80.23
99856_r_at	Catnd2	15.33	39.23	42.08
98152_at	Catns	1102.91	647.98	1268.14
98151_s_at	Catns	188.41	113.90	176.62
160280_at	Cav	846.85	405.87	424.88
92935_at	Cbfa2t1h	80.81	42.51	43.53
100291_at	Cbl	31.43	56.10	42.57
161042_at	Cbr3	88.47	168.85	114.74
95614_at	Cbx5	183.71	348.94	129.13
102736_at	Ccl2	2075.25	1101.74	2185.69
102310_at	Ccl22	49.26	25.90	52.16
94761_at	Ccl7	755.59	263.42	610.44
92459_at	Ccl8	130.44	12.93	345.39
104388_at	Ccl9	1738.13	359.38	309.48
160159_at	Ccnb1	54.71	186.47	31.41
94294_at	Ccnb2	341.83	813.78	235.05
94232_at	Ccnd1	187.89	489.90	199.07
94231_at	Ccnd1	101.48	298.61	101.43
99073_at	Ccnf	139.47	407.68	117.53

98478_at	Ccng2	425.17	139.07	324.50
93719_at	Ccrl1	34.95	13.22	15.75
99535_at	Ccrn4l	110.91	222.07	82.91
161238_f_at	Cct3	133.00	255.15	186.34
98153_at	Cct3	479.57	1009.77	562.87
93295_at	Cct5	1413.12	2516.86	1342.52
160562_at	Cct7	637.58	1342.14	821.07
160102_at	Cct8	211.36	387.57	187.84
97930_f_at	Cd151	267.64	484.70	483.27
99945_at	Cd19	27.92	57.33	59.70
100600_at	Cd24a	121.54	34.84	41.61
103005_s_at	Cd44	117.37	251.25	188.88
101516_at	Cd59a	87.93	30.57	88.42
96319_at	Cdc20	670.94	2651.67	483.68
102935_at	Cdc25c	27.61	79.96	23.13
102934_s_at	Cdc25c	76.14	197.51	69.73
100128_at	Cdc2a	458.63	1381.93	246.97
103821_at	Cdc6	76.03	201.92	41.94
102852_at	Cdh2	104.15	59.47	72.38
98532_at	Cdkap1	647.65	1125.19	781.13
96346_at	Cdo1	111.22	23.28	33.10
102215_at	Cdv1	281.73	156.46	253.44
160326_at	Cdv3	229.13	382.47	261.25
160894_at	Cebpd	3905.71	1396.36	2648.24
103064_at	Chek1	33.68	67.85	27.23
92422_at	Chga	57.38	22.26	53.71
160330_at	Chordc1	174.78	300.57	183.74
92965_at	Chrne	55.19	32.55	38.01
101973_at	Cited2	1162.03	358.74	740.71
104322_at	Ckap2	147.79	396.14	113.46
97468_at	Cks1	456.78	942.45	297.36
94465_g_at	Clcn3	22.20	60.35	53.90
94463_at	Clcn3	13.31	41.28	29.44
93274_at	Clk	1238.64	800.15	1277.61
160671_at	Cln8	59.27	103.28	103.06
93812_at	Clns1a	303.94	581.58	275.11
160132_at	Clps	58.56	19.19	52.73
100580_at	Clta	23.03	49.01	62.21
161294_f_at	Clu	35.69	7.10	32.60
93430_at	Cmkor1	149.74	51.92	91.38
101086_f_at	Cnbp	869.14	1656.96	881.70
94004_at	Cnn2	348.45	190.99	438.50
160150_f_at	Cnn3	1989.14	856.62	1244.02
92314_at	Col12a1	47.06	15.08	36.32
101130_at	Col1a2	7639.38	4621.26	8497.65
161984_f_at	Col3a1	129.41	69.41	128.63
101093_at	Col4a1	1164.28	552.37	787.13
101039_at	Col4a2	1473.70	774.77	1094.88
93220_at	Col4a5	302.45	173.48	307.96
92567_at	Col5a2	2978.03	1639.36	3891.33
162459_f_at	Col6a1	425.04	139.87	155.14
95493_at	Col6a1	2099.99	946.99	1398.79
93517_at	Col6a2	781.25	318.07	387.96
100308_at	Col8a1	931.44	262.26	948.97
93341_r_at	Copb2	1029.75	455.96	839.43
93340_f_at	Copb2	202.02	105.04	152.96
98083_at	Copeb	225.58	99.76	187.92
93582_at	Coq7	126.86	231.74	103.81
98928_at	Coro1b	689.33	385.04	744.67
99667_at	Cox6a2	25.76	76.51	101.05
97556_at	Cpd1-pending	94.86	273.78	58.69
97345_at	Cpd1-pending	84.97	197.45	77.12

99642_i_at	Cpe	2057.47	951.65	1250.48
98782_at	Cplx2	56.97	37.07	43.61
98505_i_at	Cpo	61.53	134.38	99.84
100442_at	Cpr2-pending	81.26	155.03	86.53
95341_at	Cpr2-pending	112.62	250.02	111.02
104161_at	Cpsf2	38.71	75.69	48.33
96234_at	Cpsf3	228.93	414.96	146.58
94506_at	Cpsf5	121.67	235.47	118.41
93320_at	Cpt1a	889.67	310.64	1085.52
161046_at	Crlf1	119.75	24.75	63.90
160139_at	Cryac	578.12	1016.81	769.80
99184_at	Csad	326.18	119.33	269.68
95755_at	Csda	221.82	626.00	224.01
104317_at	Cse11	65.37	142.21	79.08
101450_at	Csf1	1316.33	609.09	1499.02
94748_g_at	Csf2rb1	101.48	29.30	71.10
94747_at	Csf2rb1	64.11	8.65	15.20
104545_at	Csnk2a1-rs4	73.50	132.69	110.60
100019_at	Cspg2	1147.50	342.48	668.97
101845_s_at	Csprs	88.39	49.56	1380.16
161522_i_at	Cst3	159.92	65.39	321.46
99586_at	Cst3	3280.13	1835.93	4895.96
94831_at	Ctsb	2941.43	1743.67	4072.38
92256_at	Ctsb	62.89	36.42	50.36
92633_at	Ctsz	172.71	97.15	175.25
95349_g_at	Cxcl1	181.88	53.98	151.17
95348_at	Cxcl1	368.18	131.21	315.33
98772_at	Cxcl5	411.50	54.64	210.37
98533_at	Cyb5	541.91	176.67	245.25
103423_at	Cyb561	18.39	69.67	23.42
97013_f_at	Cyba	122.05	73.53	52.79
95072_at	Cyc1	1538.35	3048.37	1813.90
98132_at	Cycs	31.99	81.70	49.28
99979_at	Cyp1b1	903.34	228.49	894.47
104129_at	Cypf13	43.81	10.24	55.44
92777_at	Cyr61	116.83	49.01	64.87
160522_at	D0H4S114	96.44	47.08	18.36
160427_at	D10ErtD773e	273.18	461.41	275.83
98090_at	D10ErtD773e	25.10	69.40	37.24
97824_at	D11ErtD175e	498.88	1572.59	425.48
160125_at	D11ErtD497e	86.10	176.45	55.02
103746_at	D11ErtD530e	95.45	191.20	84.96
96245_at	D11ErtD619e	249.22	579.73	278.47
93775_at	D12ErtD647e	572.89	302.57	146.21
103314_at	D13ErtD275e	61.65	30.91	85.84
94452_g_at	D13Wsu123e	239.36	648.78	308.47
94451_at	D13Wsu123e	220.35	530.31	269.02
94450_at	D13Wsu123e	168.61	367.76	160.55
96223_at	D14ErtD817e	54.47	27.62	57.10
98977_at	D14Wsu146e	67.70	129.83	70.18
93716_at	D16ErtD465e	55.76	16.47	44.11
95431_at	D16Ium22e	78.96	147.46	82.26
101083_s_at	D17H6S56E-2	265.65	578.27	183.09
96829_at	D19Wsu162e	803.54	460.40	896.79
95428_at	D1Wsu40e	174.60	384.96	178.25
160248_at	D3ErtD330e	281.89	628.19	245.95
97295_at	D4ErtD421e	156.18	359.57	132.76
104466_at	D4Wsu114e	73.64	163.39	15.42
160381_at	D4Wsu125e	28.89	63.70	21.19
96861_at	D4Wsu125e	66.11	138.68	35.04
92542_at	D4Wsu53e	1414.90	769.86	1964.10
100977_at	D530020C15Rik	117.63	222.23	136.51

93973_at	D5Wsu45e	950.12	1750.34	1032.96
95618_at	D6Ertd32e	139.52	81.04	100.52
98880_at	D6Wsu116e	571.97	315.05	468.26
95541_at	D6Wsu176e	844.92	476.74	583.13
96629_at	D7Rp2e	34.16	77.66	39.83
97249_at	D7Wsu180e	251.97	519.95	337.49
160800_at	D7Wsu87e	121.01	66.61	90.45
103924_at	D8Ertd319e	200.19	385.79	159.83
92198_s_at	Daf2	86.98	14.48	40.50
103430_at	Dbn1	55.59	9.10	28.29
160841_at	Dbp	75.88	43.39	72.25
93534_at	Dcn	887.23	177.60	390.22
101367_at	Dctn1	524.74	313.09	428.28
92887_at	Ddah2	993.48	396.66	719.82
161139_f_at	Ddef1	260.20	119.74	196.53
101429_at	Ddit3	213.12	110.74	501.23
100155_at	Ddr1	303.79	116.64	310.06
94361_at	Ddx21	237.23	519.57	229.16
103598_at	Ddx9	113.44	185.51	101.39
160160_at	Dedd	66.98	41.66	54.71
160939_at	Dermo1	957.98	608.08	903.22
99544_at	Dguok	139.19	75.71	101.13
99543_s_at	Dguok	423.07	161.72	331.80
99861_at	Dhh	68.61	37.37	68.05
160715_at	DKFZp564K0822	69.53	32.44	67.79
101975_at	Dlk1	3229.88	1657.57	1203.35
94272_g_at	Dmtf1	20.75	54.64	62.36
98451_at	Dnajib10	177.46	80.45	104.85
96680_at	Dnajib9	74.22	26.90	77.98
96679_at	Dnajib9	71.72	39.06	104.37
101890_f_at	Dnajc2	136.52	286.01	136.56
100603_at	Dncic2	117.67	56.42	89.29
161726_f_at	Dnm2	53.46	92.94	94.60
102896_at	Dok1	93.76	146.19	236.21
96134_at	Dp111	35.65	150.66	51.95
104036_at	Dpp7	598.21	265.43	596.17
101503_at	Dpysl3	119.25	55.34	61.20
97220_at	Dscr2	95.28	228.73	72.16
92184_at	Dtna	45.88	14.90	29.88
96818_at	Dtx2	156.11	96.68	165.30
98619_at	Dtymk	75.42	191.95	79.95
98618_at	Dtymk	176.52	360.20	140.59
102925_at	Dusp9	17.07	98.76	20.93
97341_at	DXImx39e	460.19	188.40	293.90
161573_at	E430014N10Rik	57.74	31.87	66.39
102345_at	Ebaf	65.66	29.41	23.57
92535_at	Ebfl	262.56	72.22	128.06
96297_at	Ebna1bp2	93.56	241.88	91.51
97411_at	Ect2	59.99	243.45	64.25
161788_f_at	Edg1	45.80	16.75	25.50
100435_at	Edg2	846.83	308.99	391.46
92352_at	Edg3	828.13	416.64	642.41
102738_s_at	Edn1	75.76	24.55	19.07
102737_at	Edn1	52.62	17.54	16.47
98525_f_at	edr	2334.34	5043.07	2705.09
100992_at	Edr1	112.72	65.63	78.70
103342_at	Eed	136.43	217.35	202.21
96625_at	Eef1b2	42.89	79.61	54.69
160129_at	Eef1d	614.26	944.95	511.51
103007_at	Efna1	89.61	55.82	43.41
103041_at	Efna4	78.36	32.18	49.51
94253_at	Eif2a	385.66	707.91	360.49

94941_at	Eif2ak4	132.13	55.22	92.74
160365_at	Eif2s2	41.36	73.09	38.96
96883_at	Eif3s4	878.29	1680.32	969.83
160974_at	Eif4a2	26.76	74.16	41.92
100636_at	Eif4ebp1	94.86	225.47	160.60
94037_at	Ela2	54.07	33.14	64.65
97166_at	Elac2	60.52	115.49	60.01
92836_at	Eln	55.54	179.07	86.04
101560_at	Emb	2077.32	437.38	731.75
160568_at	Eno1	3441.12	6836.40	4905.21
96344_at	Eno3	226.59	387.70	318.74
97317_at	Enpp2	161.00	12.32	107.26
104763_at	Enpp5	209.43	127.51	496.34
95756_at	Epcs3	91.73	182.18	99.27
103980_at	Epha2	80.78	163.22	102.30
102682_at	Epha8	31.38	55.99	48.98
93469_at	Ephb3	292.58	118.04	179.42
98446_s_at	Ephb4	676.69	1739.02	951.22
94561_at	Eplin-pending	1461.87	709.26	1300.24
99397_at	Ercc2	61.44	97.13	96.55
97871_at	Ero1l	241.19	424.90	438.23
97870_s_at	Ero1l	349.79	605.81	580.95
92663_at	Esp	20.99	66.81	29.35
92662_g_at	Esp	34.88	115.15	24.78
103964_at	Esrra	188.79	312.78	203.55
160667_at	Evl	214.88	119.22	100.55
92244_at	Exo1	18.29	64.67	13.44
103051_at	Expi	52.09	17.59	14.57
100486_at	Ezh1	70.07	31.31	90.23
99917_at	Ezh2	85.94	173.44	67.65
95474_at	F2r	1734.26	572.57	1230.29
95313_at	F2r	263.82	114.37	226.78
92267_at	F2r	629.19	236.06	507.79
97689_at	F3	505.87	139.80	262.11
99977_at	Fabp6	45.95	21.53	12.35
97456_at	Fac15	81.57	345.35	205.75
160503_at	Fbl	528.25	1615.18	460.80
100928_at	Fbln2	2508.09	1268.93	1441.66
94074_at	Fcgr3	10.52	27.81	46.49
97327_at	Fen1	109.30	269.50	55.95
99321_at	Fert2	83.74	43.36	82.14
99435_at	Fgf7	967.39	260.91	473.59
97509_f_at	Fgfr1	1001.52	502.85	840.30
93091_s_at	Fgfr2	67.09	35.74	26.32
93090_at	Fgfr2	333.30	49.09	100.92
99148_at	Fhl1	548.54	905.93	493.50
100986_at	Fhl2	668.63	328.97	490.56
92365_at	Figf	389.03	156.69	875.96
160648_at	Figl1	57.08	124.27	59.11
97124_at	Fin15	13.23	56.16	8.40
97421_at	Fin16	56.03	210.76	37.58
160257_at	Fkbp1a	625.34	1032.72	542.88
92808_f_at	Fkbp4	469.35	1048.53	409.37
100420_at	Flg	44.03	15.41	25.20
97593_f_at	Fliih	433.37	242.02	562.54
95489_at	Fliih	300.17	163.59	302.11
99835_at	Fosl1	90.17	180.90	72.22
99846_at	Foxf2	316.91	97.95	218.02
98305_at	Foxm1	28.98	126.85	8.19
96183_at	Foxp1	203.53	74.79	143.83
160850_at	Fpgs	134.12	265.47	152.96
101407_at	Frda	41.83	93.47	58.47



101892_f_at	Fts	60.61	28.00	41.82
99123_s_at	Fxc1	219.13	378.36	253.27
93040_at	Fxyd1	157.44	63.43	44.52
103394_at	Fxyd5	52.00	97.31	61.83
100133_at	Fyn	167.95	43.65	82.37
93681_at	Fzd2	1802.66	800.17	1303.59
93459_s_at	Fzd4	369.08	188.93	223.89
99844_at	Fzd9	38.02	18.23	23.02
103642_at	G3bp-pending	635.87	1246.61	565.04
104333_at	G7e-pending	128.12	355.94	66.97
96869_at	Gabarap	2121.72	1049.32	1753.97
98011_at	Gabbr1	281.92	161.19	228.57
161666_f_at	Gadd45b	274.71	78.08	210.88
102779_at	Gadd45b	283.93	81.69	242.08
97820_at	Galk1	149.92	317.31	137.80
101214_f_at	Gapd	2160.88	3890.99	2701.13
100066_at	Gart	133.48	385.28	180.10
94813_at	Gas1	2487.48	762.12	1176.27
94338_g_at	Gas2	258.55	90.85	71.52
99067_at	Gas6	460.73	163.05	216.52
162095_f_at	Gas7	48.02	29.82	43.46
104678_at	Gas7	77.22	32.23	31.90
161639_f_at	Gast	43.02	18.83	38.70
102713_at	Gata4	36.87	78.79	56.10
100488_at	Gba	659.30	308.75	844.90
104597_at	Gbp2	158.93	360.30	2273.25
103202_at	Gbp3	63.75	138.32	986.29
160567_at	Gdf9	67.33	16.66	42.47
97313_at	Gdi1	600.20	310.77	552.75
99107_at	Ghr	425.51	183.03	363.94
97652_at	Ghrhr	31.05	53.67	37.25
100065_r_at	Gja1	17.02	48.67	15.26
100064_f_at	Gja1	143.30	573.69	91.87
104232_at	Gjb3	26.81	79.06	20.47
102341_at	Gla	83.74	27.22	82.45
104276_at	Glipr2	451.37	178.95	590.52
104414_at	Gnao	196.91	99.52	138.66
103843_at	Gnao	319.41	138.94	232.36
93080_at	Gng3lg	128.00	205.44	164.21
100565_at	Gnpi	140.17	66.83	101.25
102060_at	Golga4	225.14	113.74	180.85
94072_g_at	Gosr2	372.68	207.24	299.10
160649_at	Gp1bb	54.59	9.21	15.33
100573_f_at	Gpi1	191.24	329.15	221.33
102305_at	Gpr37l1	22.79	42.51	25.74
102787_at	Gpr56	20.95	92.18	39.34
102040_at	Gprk6	215.77	423.69	229.31
92263_at	Grcb	423.86	210.62	329.07
160531_at	Grcc2f	163.02	411.11	152.46
93066_at	Grn	1584.98	859.21	2444.47
160646_at	Gsr	159.08	440.92	214.48
161633_r_at	Gstm1	53.86	95.55	107.88
93009_at	Gstm2	1036.59	457.59	650.51
95019_at	Gstt1	76.64	30.82	90.31
162493_r_at	Gtf2i	28.18	71.45	54.68
103270_at	Gtse1	96.63	507.17	92.49
97525_at	Gyk	52.26	145.94	49.65
93019_at	H2afx	375.65	671.75	211.04
101954_at	H2afz	349.64	827.26	248.52
97541_f_at	H2-D1	81.58	37.30	290.91
101433_at	H2ls	83.03	32.09	65.91
102730_at	H2-M3	52.79	15.44	29.77

101341_at	H2-M9	21.02	43.98	49.98
100380_at	H3f3a	1120.91	653.99	756.18
98865_at	Has2	35.28	4.85	24.67
94781_at	Hba-a1	44.19	86.93	53.16
104376_at	Hdac5	699.58	450.29	642.45
92629_f_at	Hdgf	1509.55	2505.73	1549.93
93228_at	Hells	28.34	106.88	26.37
160887_at	Hes1	61.80	131.89	88.17
97334_at	Hes6	62.28	17.49	38.84
102898_at	Hgf	28.75	10.42	30.61
101094_at	Higl-pending	32.57	91.38	53.10
94288_at	Hist1h1c	472.65	38.86	274.82
93833_s_at	Hist1h2bc	252.69	77.51	272.24
93023_f_at	Hist1h3f	140.50	75.88	177.72
93250_r_at	Hmgb2	38.07	73.81	12.33
98038_at	Hmgb3	228.88	439.78	151.04
94102_at	Hmx1	9.03	29.84	12.80
100371_at	Hnrpa1	30.71	63.96	28.41
93117_at	Hnrpa2b1	763.11	1219.73	754.06
94303_at	Hnrpd	378.30	630.24	296.35
95297_at	Hoxa1	44.27	10.05	32.44
96092_at	Hp	139.51	78.73	110.76
99815_at	Hrh2	20.81	53.86	60.92
96696_at	Hrmt112	360.54	669.66	325.59
102370_at	Hsd17b11	407.33	164.78	440.88
94177_at	Hsd17b7	340.62	163.31	189.28
95282_at	Hsp86-1	2371.57	4565.36	1428.01
100353_g_at	Hspa4	434.62	703.25	466.02
97914_at	Hspa9a	728.57	1239.91	935.07
92829_at	Hspe1	839.71	1713.48	767.30
101764_at	Htr1d	62.03	98.32	69.08
92919_at	Htr3a	28.19	58.90	41.78
92504_at	Hus1	32.94	132.57	21.62
93013_at	Idb2	370.53	72.69	187.35
92614_at	Idb3	813.29	261.43	552.13
94380_at	Ide	99.93	183.19	90.05
160571_at	Idh1	841.72	402.30	542.99
104500_at	Idua	105.47	37.92	96.40
97409_at	Ifi1	38.54	12.95	326.63
97444_at	Ifi30	142.16	276.37	128.35
161067_at	Ifld2	49.97	93.71	169.48
101791_f_at	Ifna5	57.02	24.29	55.83
100483_at	Ifnar1	107.69	30.10	79.44
101015_s_at	Ifnar2	47.37	22.24	64.34
104760_at	Ifrd2	94.91	411.44	83.76
102224_at	Igflr	966.34	424.03	736.74
98623_g_at	Igf2	241.64	51.34	125.62
92301_at	Ikbke	70.67	14.92	75.57
93874_s_at	Il11ra2	633.79	381.77	454.98
98240_at	Il12rb1	26.03	44.82	61.70
103723_at	Il13ra1	36.81	77.55	267.72
161023_at	Il15ra	49.88	128.85	115.90
98501_at	Il1rl1	1860.22	399.95	288.25
98500_at	Il1rl1	655.09	179.92	177.68
102218_at	Il6	36.80	13.04	55.43
98390_at	Impdh1	104.68	242.40	139.85
100578_at	Impdh2	502.29	1415.38	371.33
104468_at	Incenp	60.99	117.98	57.94
102266_at	Inha	37.38	10.44	65.54
103811_at	Invs	80.57	36.00	64.00
161511_f_at	Isg15	8.98	23.42	397.76
103634_at	Isgf3g	108.79	31.48	305.07

99010_at	Islr	228.39	47.38	159.46
161497_f_at	Itga7	17.74	45.67	18.27
94826_at	Itgb4bp	328.93	568.65	377.28
161786_f_at	Itgb5	573.83	357.05	443.73
100906_at	Itgb7	177.60	467.96	626.94
101123_at	Itm2b	1707.47	740.60	2164.63
96283_at	Itm2c	1518.17	980.87	1480.57
101457_at	Jak2	54.03	30.46	66.28
102364_at	Jund1	2409.90	1472.79	2293.11
102725_at	Kcnab1	35.60	6.74	7.35
98825_at	Kcne1	52.08	30.52	45.69
94185_at	Kcnk4	67.30	34.50	80.76
102198_at	Kcnn4	156.48	388.16	216.57
101624_at	Kcns1	38.10	21.99	38.65
99541_at	Kif11	55.71	170.59	30.94
161856_f_at	Kif20a	126.64	359.09	101.86
160501_at	Kif20a	76.58	175.71	52.84
95118_r_at	Kif22-ps	265.70	601.20	168.07
96168_at	Kif23	61.92	155.78	53.72
160755_at	Kif2c	164.10	382.42	92.16
104644_at	Kif4	53.87	103.60	35.89
100113_s_at	Kifap3	482.38	168.27	311.08
100011_at	Klf3	307.65	119.51	269.81
92790_at	Kpna2	114.41	199.79	59.30
93111_at	Kpnbl	686.23	1522.86	425.07
93070_at	Kpnbl	138.74	300.90	132.45
97814_at	Krt1-3	28.93	73.85	52.92
104370_s_at	Krt2-6a	24.95	14.99	17.80
92765_s_at	Ksr	31.97	17.05	36.79
101590_at	Lamp2	1238.47	506.46	1222.02
100136_at	Lamp2	299.25	149.17	438.67
96876_at	Laptn4a	3590.82	2242.39	4407.36
96123_at	Lbp	1088.50	460.26	1620.66
160890_at	Lbr	230.37	525.10	176.20
103665_at	Lce-pending	212.68	395.59	110.18
96072_at	Ldh1	2867.77	6151.84	3579.00
160618_at	Lgals8	57.67	30.95	69.52
103060_at	Lgi4	28.37	59.59	52.71
93753_at	Litaf	880.26	486.38	845.30
101414_at	Lmnbl	66.85	118.14	51.63
93939_at	Lnk	85.48	165.71	90.44
103580_at	LOC215751	179.16	92.81	142.93
103444_at	LOC216023	25.77	63.76	25.78
96241_at	LOC216169	11.78	46.82	20.52
96529_at	LOC217030	39.05	22.06	48.57
160394_at	LOC217449	161.58	77.23	103.27
97330_at	LOC224742	503.78	881.42	519.22
104610_at	LOC226169	62.27	114.11	60.75
104677_at	LOC227619	217.32	141.64	199.84
103694_at	LOC227699	111.27	209.86	122.71
104080_at	LOC231887	294.33	620.01	226.58
160684_at	LOC232210	51.81	161.01	67.76
104361_at	LOC232337	338.90	159.46	225.98
95032_at	LOC233406	178.31	467.75	109.91
160802_at	LOC235036	55.87	135.17	56.60
161177_f_at	Lox	72.92	22.53	39.83
160095_at	Lox	3941.43	966.76	1763.19
101073_at	Lrp1	2161.44	979.19	2042.96
161625_r_at	Lrp10	51.03	15.80	106.75
96186_at	Lrp10	624.61	345.39	615.18
92564_at	Lrrfip1	26.84	58.14	31.67
93008_at	Lsm4-pending	341.38	809.02	345.84

161914_s_at	Lsp1	77.44	29.41	57.62
104093_at	Lsp1	71.97	19.71	13.52
103571_at	Lst1	167.32	36.10	172.31
160782_at	Lt1	115.95	196.12	109.63
92335_at	Ltbp2	406.58	98.98	93.35
96065_at	Lxn	689.06	95.96	174.40
101487_f_at	Ly6e	3872.18	6614.07	10090.79
99632_at	Mad211	127.10	287.88	48.48
103237_at	Mad3	75.73	125.42	45.57
104220_at	Madh6	198.59	111.60	157.20
92216_at	Madh7	87.89	50.67	73.61
100302_at	Maff	20.85	52.55	25.91
96703_at	Maged1	3479.92	2137.55	2965.09
94289_r_at	Maged2	899.18	377.54	578.63
98988_at	Mail-pending	99.18	61.69	134.31
160579_at	Man1a	143.21	82.17	88.74
104628_at	Man2a1	1427.84	548.68	749.43
99562_at	Man2b1	656.60	296.54	711.48
96935_at	Map17-pending	197.19	75.89	169.80
160288_at	Map1lc3	1034.60	495.77	829.09
160287_at	Map1lc3	1111.85	535.44	942.34
93315_at	Map2k3	548.82	987.40	457.35
96865_at	Marcks	104.00	51.75	25.14
98475_at	Matn2	989.55	304.32	447.49
101385_at	Mbd3	585.86	1060.24	533.05
160496_s_at	Mcmd	261.37	680.04	123.14
100062_at	Mcmd	108.01	308.68	55.37
93112_at	Mcmd2	157.79	342.01	76.42
93041_at	Mcmd4	388.84	751.78	195.23
100156_at	Mcmd5	346.75	717.22	153.10
93356_at	Mcmd7	271.12	762.45	212.53
93622_at	Mcpt6	14.96	32.20	25.57
160561_at	Mdk	10.77	37.57	12.57
100309_at	Met	76.41	20.74	35.29
99518_at	Mfap5-pending	97.11	18.00	17.86
97970_at	Mfi2	22.66	37.38	53.59
103212_at	MGC11998	95.25	325.22	197.36
102207_at	MGC12117	166.42	38.79	148.07
96755_at	MGC18745	458.04	769.10	364.67
160234_at	MGC25559	128.63	253.92	121.83
103078_at	MGC25977	264.83	120.75	276.47
94967_at	MGC28180	172.14	401.85	228.49
162055_f_at	MGC31450	68.70	44.99	65.97
161895_s_at	MGC32441	718.83	358.28	721.62
160265_at	MGC36374	176.17	335.64	179.34
161076_at	MGC36997	115.97	229.27	84.71
104119_at	MGC37079	136.33	65.26	114.80
104742_at	MGC41409	151.17	42.59	65.71
92774_at	MGC6685	14.82	69.32	21.78
93600_at	MGC6694	564.69	250.89	387.71
94499_at	Mgea5	407.46	227.95	378.70
101453_at	Mia	18.42	35.45	28.87
160435_at	Mic211	194.32	113.49	197.06
99457_at	Mki67	97.38	299.44	38.98
93342_at	Mki67ip	49.74	80.78	34.76
101070_at	Mkrl1	103.85	64.28	81.10
97203_at	Mlp	836.90	359.20	418.88
100016_at	Mmp11	187.46	70.86	149.50
160118_at	Mmp14	3341.71	965.60	2496.07
103468_at	Mns1	11.27	37.09	6.86
92300_at	Mnt	235.55	123.38	213.17
103653_at	Mras	124.21	61.34	92.29

160431_at	Mrpl12	221.68	686.51	250.68
102019_at	Mrpl13	186.68	392.68	216.46
96296_at	Mrpl15	147.91	290.65	164.60
100040_at	Mrpl17	88.07	141.54	88.97
94875_at	Mrpl20	139.62	214.07	159.44
96335_at	Mrpl38	218.46	409.84	292.63
100886_f_at	Mrpl45	153.91	295.55	180.39
97884_at	Mrps11	154.92	260.85	169.04
160621_at	Mrps22	44.64	75.03	41.95
104234_at	Mrps25	57.96	114.51	56.60
100033_at	Msh2	120.50	245.99	92.20
160488_at	Msh3	10.31	48.38	17.26
100286_at	Mst1	51.07	18.26	16.67
100046_at	Mthfd2	212.77	719.53	376.29
100071_at	Mup2	26.11	73.70	29.75
103793_at	Mvp	250.48	126.93	377.84
100023_at	Mybl2	13.24	105.28	11.57
104712_at	Myc	90.38	26.88	60.52
102581_at	Myes	18.20	43.51	34.71
102265_at	Myf6	9.60	24.60	10.04
100915_at	Myh9	2522.60	1461.04	2139.40
100828_at	Myla	49.18	18.96	49.17
100923_at	Myo10	1122.35	292.55	775.63
94060_at	Myo1h	1489.28	712.88	1168.13
94713_at	Myo7a	191.13	111.97	251.96
103637_at	Naga	246.69	143.89	208.85
93373_at	Naglu	362.59	215.75	434.21
104147_at	Nans	286.94	477.09	216.52
98587_at	Nap111	428.20	872.67	314.34
98586_at	Nap111	60.61	119.15	27.96
96152_at	Narg1	213.69	382.44	320.43
93246_at	Narg1	115.26	197.72	142.49
101108_at	Nasp	41.11	72.51	34.47
101484_at	Nbr1	829.62	465.63	782.05
100153_at	Ncam1	302.09	143.75	234.04
160521_at	Ncl	25.31	64.50	51.94
100144_at	Ncl	1283.18	3452.39	1214.60
101059_at	Ndn	336.34	171.00	193.32
160819_at	Ndr4	181.54	100.95	105.18
100885_at	Nek2	113.79	303.25	107.79
103549_at	Nes	28.39	60.33	44.47
101805_f_at	Nfil3	150.64	77.18	129.99
101554_at	Nfkb1a	401.48	256.71	249.28
100120_at	Nid1	80.61	46.80	54.44
93563_s_at	Nid2	47.95	11.71	50.54
93318_at	Ninj1	17.14	104.19	38.16
96422_at	Nkx2-9	17.28	44.18	13.51
96804_at	Nol1	225.60	501.02	252.28
92569_f_at	Nol5	76.70	217.72	81.07
104766_at	Nola1	394.40	1197.84	277.94
95735_at	Nolc1	38.33	85.67	29.92
98114_at	Npc1	469.38	208.44	314.00
160344_at	Npc2	4013.80	2104.24	5813.78
92626_at	Npdc1	847.18	386.50	789.74
101634_at	Npm1	2076.90	3442.27	1622.49
102796_at	Npm3	109.77	268.19	94.72
92248_at	Nr4a2	34.50	13.83	35.75
95016_at	Nrp	478.47	194.13	473.38
103654_at	Nsbp1	65.65	103.40	59.30
161463_f_at	Nsg1	55.72	18.79	19.46
101099_at	Nsg1	91.42	27.01	31.71
98048_at	Nssr	43.92	95.43	61.19

94839_at	Nucb	1116.83	704.07	1387.54
102197_at	Nucb2	71.77	35.91	95.87
160084_at	Odc	109.24	212.05	78.86
160877_at	Ogn	933.27	217.19	1231.89
99549_at	Ogn	735.88	143.29	583.81
160838_at	Orc2l	37.28	69.82	20.25
95712_at	Orc6l	169.83	401.66	132.76
103311_at	Osbp15	207.56	131.13	173.36
92593_at	Osf2-pending	226.25	20.51	32.53
102255_at	Osmr	560.90	197.93	826.24
99489_at	Osp94	105.19	198.88	181.82
95586_at	P2rx4	231.09	117.99	223.82
100125_at	Pa2g4	62.05	285.67	44.09
92775_at	Pabpc4	547.47	1205.93	380.30
98021_at	Paf53-pending	28.87	71.97	34.21
160681_at	Papola	68.34	139.89	91.66
100697_at	Pax3	10.59	20.72	10.98
94803_at	Pbx1	98.28	41.18	100.32
102280_at	Pcdh7	99.84	27.24	60.87
101650_at	Pcdha6	83.29	20.43	51.97
94449_at	Pcdhga10	3293.31	1272.68	3193.62
101065_at	Pcna	291.22	826.29	203.63
99663_g_at	Pcnt2	313.81	776.30	228.69
99662_at	Pcnt2	114.07	230.45	78.25
104674_s_at	Pcsk4	31.69	100.83	17.23
103029_at	Pdcd4	276.78	137.60	185.54
93382_at	Pdelb	11.89	29.32	31.18
95079_at	Pdgfra	2362.61	475.28	1446.50
160867_at	Pdgfrb	248.34	91.05	115.76
94806_at	Pdhh	335.89	566.59	385.31
102049_at	Pdk4	175.32	38.12	100.17
100554_at	Pdlim1	72.23	220.94	187.99
101451_at	Peg3	208.30	72.01	87.84
93619_at	Per1	122.43	63.14	121.44
94491_at	Pex13	73.14	38.05	49.15
102252_at	Pfdn2	265.20	508.99	258.45
93421_at	Pftk1	278.59	116.58	136.82
160091_at	Pgam1	1111.35	2647.41	1354.63
93039_at	Pgcp-pending	336.72	116.47	414.32
93346_at	Pgk1	1429.94	3445.73	1982.01
94855_at	Phb	101.67	168.02	79.23
92867_at	Phc2	148.77	257.04	198.05
104239_at	Phemx	60.79	30.75	51.45
95649_at	Phf5a	130.43	257.34	168.69
162168_r_at	Phgdh	22.98	73.71	35.86
102385_at	Picalm	178.26	344.80	188.06
96592_at	Pik3r1	195.22	74.59	112.75
104557_at	Pitpnb	182.24	312.39	190.16
97375_at	Pkd1	331.53	170.73	328.39
92549_at	Pkig	215.43	385.62	222.00
101472_s_at	Pklr	9.92	41.80	11.93
162032_f_at	Pkm2	918.80	1986.69	1438.09
102663_at	Plaur	46.02	93.14	76.39
104580_at	Plcd	184.01	59.16	171.01
100607_at	Pld3	292.67	100.95	285.09
93929_s_at	Plf	93.45	34.16	35.97
93883_at	Plf2	250.84	100.17	71.01
161292_f_at	Plk	26.36	172.69	37.60
93099_f_at	Plk	116.59	335.85	81.31
104140_s_at	Pm5-pending	1254.96	2083.21	1968.61
102395_at	Pmp22	453.12	266.20	480.79
96136_at	Pmscl2	39.82	67.78	37.09

103207_at	Pola1	74.27	206.29	55.35
98006_at	Pola2	184.25	476.89	149.12
103057_at	Pold1	136.39	378.82	121.55
98155_r_at	Pold2	351.32	972.08	297.16
101920_at	Pole2	20.50	52.38	8.00
104690_at	Polm	622.81	317.79	528.84
93325_at	Polr2e	94.76	154.46	79.27
98508_s_at	Ppap2a	944.30	426.79	592.98
101055_at	Ppgb	2083.80	1118.01	1995.75
100089_at	Ppic	358.23	214.43	181.31
92879_at	Ppm1g	303.54	616.09	363.30
100429_at	Ppox	111.63	58.56	111.74
97979_at	Ppp1r7	142.91	232.74	150.53
95092_at	Ppp3ca	615.90	275.80	467.54
97532_at	Ppp5c	70.86	154.86	69.03
102836_at	Pps	175.03	114.93	188.36
103975_at	Prdc-pending	73.01	9.18	10.37
93495_at	Prdx4	736.13	390.31	329.47
100983_at	Prep	100.93	214.05	114.20
93116_at	Prkacb	576.35	306.47	465.63
97096_at	Prkar2a	29.32	132.32	40.84
94087_at	Prkcm	146.42	90.29	138.93
162056_f_at	Prm3	21.16	43.72	14.77
100606_at	Prnp	2701.86	1281.86	2648.41
95585_at	Proc	16.09	67.58	34.10
98383_r_at	Prpmp5	47.15	9.56	73.92
161897_f_at	Prps1	28.91	58.00	45.44
95507_at	Prps1	171.21	498.40	160.33
99021_at	Prrx1	457.05	145.05	265.67
103327_at	Prrx2	632.60	358.81	437.81
96295_at	Psat-pending	1316.46	2795.27	1465.28
104257_g_at	Pscdbp	103.47	273.40	182.95
104256_at	Pscdbp	31.89	95.40	81.29
99930_s_at	Psен2	71.33	31.88	55.13
92544_f_at	Psma3	1181.17	1947.98	1449.57
94841_at	Psma5	740.06	1283.15	897.61
93988_at	Psma7	672.72	1136.69	693.11
101486_at	Psmb10	187.03	610.66	1046.66
94025_at	Psmb3	1173.90	2208.25	1602.21
101992_at	Psmb6	479.69	844.06	635.44
94263_f_at	Psmb7	348.22	641.08	329.72
93971_f_at	Psmd12	217.68	379.95	209.14
92769_at	Psmd3	1006.65	1676.43	1119.62
103350_at	Psmd7	550.18	1100.81	625.60
103386_at	Pte1	27.52	15.37	45.63
160614_at	Pten	406.14	184.52	256.59
97769_at	Ptgrfr	436.54	96.56	177.10
161694_f_at	Ptgs1	115.56	64.70	69.91
97474_r_at	Ptn	90.80	38.75	75.31
99599_s_at	Ptov1	2137.86	1288.57	1712.32
102840_at	Ptpn12	26.23	51.46	40.60
160760_at	Ptprk	277.64	126.59	171.19
160844_at	Pts	68.58	29.41	70.74
101027_s_at	Pttg1	276.73	634.63	195.41
92731_at	Ptx3	592.68	129.31	506.31
99933_at	Pvr12	412.60	158.91	377.86
96948_at	Qdpr	346.96	666.16	300.38
160608_at	Rab20	40.92	25.02	44.28
104108_at	Rab6ip1	394.88	253.54	320.83
95516_at	Rab9	443.53	242.60	393.75
94269_at	Rabac1	2096.99	1140.35	1702.94
93851_at	Rabgta	23.85	64.36	16.70

94953_at	Racgap1	118.09	262.17	71.21
99005_at	Rad1	91.52	152.50	39.63
104527_at	Rad51	71.02	189.69	54.03
93676_at	Rad51ap1	113.74	250.20	95.49
104166_at	Rage	69.94	20.18	12.52
161778_i_at	Ralgds	14.29	35.04	29.12
92368_at	Ramp3	149.56	82.34	86.54
101254_at	Ran	3763.30	6742.22	3388.65
97812_at	Ranbp9	114.77	57.88	91.21
98603_s_at	Rangap1	158.63	480.69	114.33
98602_at	Rangap1	309.92	711.41	198.29
100562_at	Rangnrf-pending	107.42	280.01	73.45
93319_at	Rasa3	560.67	241.49	336.92
102821_s_at	Rasl2-9	2723.90	4954.48	2212.75
99343_at	Rbbp7	68.33	43.14	46.40
93222_at	Rbbp9	48.81	27.74	23.74
104476_at	Rbl1	50.21	106.16	47.23
97254_at	Rbm8	237.36	536.43	287.06
97848_at	RbmX	68.84	38.01	44.94
160192_at	RbmXrt	243.62	450.07	224.20
104716_at	Rbp1	1535.20	477.76	784.67
102399_at	Rbpms	160.62	104.90	100.68
95124_i_at	Rbx1	337.80	535.78	408.02
98336_s_at	Recc1	7.72	65.96	38.93
103804_at	Reck	178.82	34.76	166.39
160741_at	Recql	23.85	48.40	33.00
160633_at	Refbp1	371.42	885.21	339.98
103091_at	Relb	119.66	76.30	136.90
161231_r_at	Reln	21.59	44.24	38.79
103457_at	Rev3l	306.41	107.38	167.41
95612_at	Rfc5	105.43	332.12	79.88
92710_at	Rgnf	91.56	18.48	68.10
97844_at	Rgs2	90.70	42.88	138.24
160747_at	Rgs3	368.68	214.44	242.20
160827_at	Rin2	1199.61	406.02	685.97
161787_f_at	Ris2	120.91	257.66	71.49
94024_at	Ris2	199.05	704.63	131.37
98042_at	Risc-pending	307.10	191.19	444.58
98923_at	Rnac-pending	99.76	210.55	81.49
101965_at	Rnf13	66.81	30.41	59.76
98624_at	Rnpc1	81.76	222.53	116.73
93518_at	Rnps1	388.10	949.21	470.16
98504_at	Rock2	122.70	199.05	255.40
95427_at	Rpa1	422.02	756.43	242.34
92834_at	Rpl13a	774.78	1671.99	866.30
94240_i_at	Rpl29	96.88	4.64	68.48
102098_at	Rpl44	2830.68	6076.49	3246.87
98081_at	Rpo1-3	172.56	293.07	182.99
93620_at	Rpo1-4	178.58	385.94	196.10
92850_at	Rrbp1	614.21	378.59	661.66
102001_at	Rrm2	143.16	438.51	72.26
96778_at	Rrr-pending	200.03	417.96	140.48
102797_at	Rsdr1-pending	99.15	34.30	134.18
160484_at	Rtn4	1804.30	1082.24	1311.26
92399_at	Runx1	98.06	37.16	44.33
92676_at	Runx2	101.31	57.69	91.83
99537_at	Ruvbl1	291.92	665.46	286.23
160422_at	Ruvbl2	274.02	1002.12	293.13
101051_at	S100a3	66.35	109.23	79.88
102193_at	Sah	64.61	106.99	64.90
160068_at	Sap30	87.40	55.38	46.96
102769_f_at	Sc5d	79.94	41.81	37.73



100095_at	Scarb1	638.34	1043.98	569.96
94424_at	Scd1	84.86	129.65	101.38
160708_at	Schip1	52.90	107.95	61.76
103715_at	Scin	26.76	49.67	38.77
102808_at	Scn1b	74.55	24.71	46.14
96345_at	Sdbcag84	794.34	498.82	858.46
95104_at	Sdc2	560.96	174.57	488.01
104709_at	Sec23a	565.29	282.49	443.80
100596_at	Selenbp1	7.94	53.06	35.72
102623_at	Sema3f	81.55	35.86	102.50
92618_at	Serf2	73.97	35.26	75.96
104374_at	Serpina3n	197.47	92.09	134.42
162429_r_at	Serpinf1	12.47	40.92	17.57
98550_at	Set	258.18	549.08	269.76
92196_f_at	Sf3a2	1030.93	2168.75	1506.23
99621_s_at	Sfpq	240.69	437.11	203.12
99620_at	Sfpq	33.08	55.78	25.83
97997_at	Sfrp1	161.95	57.71	336.10
93503_at	Sfrp2	435.55	207.97	167.96
92469_at	Sfrp4	5.95	25.80	17.86
160539_at	Sfrs1	98.54	198.78	90.73
96834_at	Sfrs9	549.25	985.37	518.21
92831_at	Sfxn1	252.45	518.52	325.43
93898_at	Sgcb	139.01	57.37	171.42
97890_at	Sgk	732.50	303.96	497.03
96127_at	Sgpl1	576.34	306.36	548.77
96126_at	Sgpl1	524.53	316.22	442.53
98459_at	Shmt1	73.65	325.53	64.15
97906_at	Siah2	80.75	171.33	90.27
99847_at	Siat4a	520.20	206.51	459.79
95599_at	Siat4c	135.38	70.21	126.61
100279_at	Siat5	124.64	75.06	75.81
96682_at	Siat7d	33.77	139.23	95.87
98596_s_at	Siat9	388.46	186.90	314.80
95502_at	Sirt2	538.06	344.90	458.98
92722_f_at	Six1	196.28	74.82	137.06
93000_g_at	Six4	106.98	53.88	74.23
97122_at	Six5	49.55	18.96	24.94
160471_at	Slbp	64.08	114.35	47.34
99500_at	Slc12a2	1025.22	408.12	541.95
101588_at	Slc16a1	27.80	64.20	34.40
101623_at	Slc16a8	18.92	52.50	35.22
94419_at	Slc19a1	97.93	316.96	67.31
104007_at	Slc25a15	66.89	150.12	37.87
97472_at	Slc25a17	342.13	179.56	186.18
95733_at	Slc29a1	173.41	361.54	135.29
93738_at	Slc2a1	257.10	460.34	297.46
104286_at	Slc38a4	214.12	392.08	190.00
92987_at	Slc4a3	300.63	178.38	332.51
104221_at	Slc7a5	213.60	750.34	385.71
162329_r_at	Slpi	103.48	42.31	48.84
161650_at	Slpi	2810.06	1485.08	1687.79
92858_at	Slpi	6935.67	3983.53	4361.48
100272_at	Smcy	11.43	20.51	44.87
103620_s_at	Smn	219.02	420.17	196.67
96926_at	Smoc2	96.67	26.91	41.85
99552_at	Snai2	1036.42	503.54	564.27
160792_at	Snap25bp	649.05	332.84	576.18
92310_at	Snk	1312.13	673.73	1218.16
97429_at	Snrk	145.44	61.02	121.21
100577_at	Snrpd1	40.10	65.48	41.30
95049_at	Snrpd2	1032.14	2223.45	1046.18

93999_at	Snrpg	608.43	1274.31	376.66
102890_at	Snta1	78.00	122.73	130.15
93598_at	Snx5	77.34	163.50	77.18
99475_at	Socs2	275.61	122.62	241.90
96042_at	Sod2	48.84	115.42	91.71
98400_at	Solt	42.48	78.50	22.35
102856_at	Sox10	75.65	43.79	81.16
160109_at	Sox4	3386.75	478.50	1709.95
101430_at	Sox4	1250.34	149.24	511.17
101847_at	Sp100	10.88	29.94	146.53
92412_s_at	Spag5	16.01	61.37	18.79
97160_at	Sparc	1304.66	656.21	892.04
160319_at	Sparcl1	47.23	15.35	16.97
103839_at	Sphk1	160.73	55.62	117.06
101576_f_at	Spi1-2	79.76	43.12	67.81
103345_at	Spna2	530.48	283.10	486.30
93557_at	Sps2	103.48	170.51	82.07
92540_f_at	Srm	228.57	858.24	231.99
93488_at	Srr	256.84	507.73	213.19
160298_at	Ssg1-pending	194.12	72.86	156.93
102378_at	Sspn	77.39	47.62	48.11
95069_at	Ssrp1	658.16	1335.68	463.19
101465_at	Stat1	103.39	57.03	679.13
99100_at	Stat3	623.78	287.29	603.68
99099_at	Stat3	941.55	423.66	931.50
102624_at	Stc2	42.17	74.37	54.29
100081_at	Stip1	147.63	341.47	163.08
98996_at	Stk18	98.78	274.24	50.28
92436_at	Stk23	6.39	24.60	6.47
92639_at	Stk6	92.02	275.30	58.00
96289_at	Stoml2	302.38	557.59	302.70
98861_at	Sts	12.40	44.55	25.74
96663_at	Surf6	26.07	55.23	26.76
98339_at	Syt11	41.64	15.36	16.92
97238_at	Tacc3	29.66	76.17	25.25
93541_at	Tagln	100.98	46.93	55.95
160162_at	Tagln2	887.16	1775.24	978.54
96531_at	Tbl3	144.43	316.11	117.50
104655_at	Tbx2	9.45	27.02	44.67
92602_at	Tcap	25.50	51.07	51.45
101527_at	Tceal	508.95	828.72	520.73
162159_i_at	Tcf2	9.66	37.16	10.31
97660_s_at	Tcf7l2	76.39	26.64	40.26
94135_at	Tcfcp2	110.62	59.54	111.07
93736_at	Tcn2	284.14	99.87	279.05
104145_at	Tcof1	193.19	407.71	182.24
94218_at	Tcp1	76.33	156.23	94.16
103387_at	Tctex3	266.50	165.64	308.68
100151_at	Tdel	619.69	351.35	620.46
96940_at	Tead2	401.62	200.55	155.78
160117_at	Tef	252.53	107.07	243.63
97402_at	Temt	45.95	94.89	81.87
93367_at	Tep1	80.56	19.67	60.49
103385_at	Tera-pending	126.37	218.75	106.82
94104_at	Tert	64.46	34.70	58.23
101551_s_at	Tes	224.70	129.23	223.87
102315_at	Tex292	223.75	501.21	217.58
101959_r_at	Tfdp1	403.32	772.17	216.21
101958_f_at	Tfdp1	101.28	198.65	70.89
98019_at	Tgfbli1	371.03	201.75	310.23
93728_at	Tgfbli4	462.23	262.36	381.63
102906_at	Tgtp	161.52	37.15	2952.75

104601_at	Thbd	146.65	38.43	181.49
160469_at	Thbs1	1013.92	86.68	555.22
94930_at	Thbs2	1637.02	371.29	617.47
104025_at	Thop1	100.27	256.53	108.07
92348_at	Thra	936.88	542.49	817.70
99947_at	Tial1	219.57	348.15	240.05
100953_at	Timeless	88.60	168.59	87.10
95441_at	Timm23	480.75	939.02	484.35
96849_at	Timm8a	92.06	345.71	75.87
93507_at	Timp2	1291.72	477.65	935.29
96081_at	Tk1	213.52	984.29	116.79
101356_at	Tk2	101.60	56.18	76.15
98304_at	Tlr6	53.48	22.41	40.60
103923_at	Tm7sf1	200.07	72.62	99.11
103017_at	Tm7sf1	286.03	119.39	159.41
100039_at	Tmem4	316.27	134.93	274.29
92782_at	Tmpo	294.89	486.51	273.68
98129_at	Tmsb10	2395.94	1275.49	1584.37
96426_at	Tmsb4x	297.00	93.53	276.44
101993_at	Tnc	618.75	165.19	474.38
101632_at	Tnfrsf11a	41.75	14.00	64.46
94266_at	Tnfrsf12a	2288.62	940.29	1792.15
102281_at	Tnfrsf7	42.67	23.29	35.41
92415_at	Tnfsf9	40.47	94.04	50.20
104755_at	Tnip1	304.54	202.82	251.29
100593_at	Tnnt2	14.04	53.22	21.30
162418_r_at	TOB3	41.21	14.48	39.20
99578_at	Top2a	182.78	434.83	75.12
95345_at	Tpbg	617.78	346.72	468.07
99566_at	Tpi	1053.97	2502.29	1478.39
160532_at	Tpm1	1010.36	469.97	625.59
162407_at	Traip	25.79	14.36	47.92
162114_f_at	Trfp	67.51	118.24	83.59
103958_g_at	Trfr	562.09	1211.21	593.91
103957_at	Trfr	55.72	206.00	42.96
100553_at	Trim27	225.97	606.45	229.77
104275_g_at	Trp53	331.79	566.86	308.92
103201_at	Ttk	41.23	88.75	27.81
100342_i_at	Tuba1	5790.51	1930.77	4213.74
94835_f_at	Tubb2	1408.71	568.45	1011.31
104067_at	Tubgcp3	65.77	102.98	67.50
102032_at	Twg-pending	460.35	227.19	384.14
92807_at	Txn1	2761.70	4450.68	2919.24
160547_s_at	Txnip	655.76	239.94	685.18
93237_s_at	Tyms	87.22	169.52	53.87
93236_s_at	Tyms	79.67	207.12	79.02
100756_r_at	Tyms-ps	86.15	214.40	147.60
97486_at	U2af1	232.04	482.12	301.90
99954_at	U3-55k-pending	183.13	350.61	212.13
162125_f_at	Ubc	1644.29	991.19	2027.26
93509_at	Ube2b	171.10	87.33	177.83
162499_f_at	Ube2d2	48.68	28.22	30.62
97901_at	Ubtf	444.69	717.64	386.88
100512_at	Uchl5	29.52	92.59	25.90
94367_at	Uck2-pending	624.63	1191.71	512.82
100091_at	Ugalt2	1456.49	896.27	1529.57
96623_at	Ugcg	361.94	159.09	221.38
94481_at	Ugp2	97.21	56.91	52.97
92209_at	Ulk1	131.20	75.25	108.49
95537_at	Ulk2	43.69	21.58	36.92
101455_at	Umps	39.60	90.61	15.53
100030_at	Upp	18.28	39.49	109.58

97894_at	Vars2	280.81	734.97	372.99
101509_at	Vbp1	373.92	648.45	307.32
92560_g_at	Vcam1	342.01	193.18	395.22
92559_at	Vcam1	137.89	35.98	114.00
94963_at	Vcl	1207.49	484.77	953.98
99964_at	Vdr	165.98	30.79	181.01
104177_at	Vig1-pending	4.59	23.92	850.88
98777_at	Vipr1	43.54	20.53	37.86
103824_at	Wfs1	378.64	127.98	258.44
94704_at	Wisp2	51.28	24.35	35.53
103717_at	Wwp2-pending	103.83	67.59	118.31
97950_at	Xdh	245.44	71.98	431.09
102818_at	Xmr	88.58	33.87	46.87
92384_at	Xpa	50.66	19.33	37.70
94228_at	Xpo1	118.48	213.68	106.88
93564_at	Yars	280.84	522.89	315.27
99052_at	Zfhx1a	267.27	164.08	219.17
92443_i_at	Zfp1	72.72	30.85	63.88
103718_at	Zfp144	159.55	74.64	156.71
92409_at	Zfp260	63.57	37.51	47.90
104437_at	Zfp30	74.23	40.72	43.30
93324_at	Zfp3611	689.58	188.57	325.86
95801_s_at	Zfp63	68.07	38.13	37.37
95521_s_at	Zfp68	109.69	63.34	74.61
92934_at	Zfp90	57.10	29.03	44.58
104738_at	Zrf2	97.26	230.03	111.64
95157_at	Zrfp1-pending	90.50	37.45	27.47
95155_at	Zrfp1-pending	233.19	135.89	213.18

Tabelle 2: Direkte IRF-1 Zielgene

ProbeSetID	Gen Symbol	Induktionsfaktor				Als IRF-1 reguliert in:	beschrieben
		6h CHX + 4h E2		8h CHX + 6h E2			
		Exp.1	Exp.2	Exp.1	Exp.2		
161947_f_at	Alox12e	1.36	1.37	5.61	4.50	(Liu et al., 2005)	
92805_s_at	Arl4	9.33	4.57	12.25	-1.16		
101180_at	Atm	2.54	3.76	3.04	7.13		
96035_at	Bckdha	3.75	3.22	-1.08	-1.58		
161028_at	Bmp6	3.38	-1.98	4.25	5.21		
98406_at	Ccl5	55.87	14.87	16.32	22.48		
102124_f_at	Cox4a	1.50	-1.17	3.88	3.78		
100127_at	Crabp2	-2.44	4.46	4.96	4.17		
101845_s_at	Csprs	6.03	10.32	34.56	75.47		
93858_at	Cxcl10	9.08	6.47	12.84	5.54		
103254_at	Trafd1	3.23	3.85	6.71	3.42	(Buttmann et al., 2007; Veckman et al., 2006)	
100675_at	Gabrr1	3.59	6.09	-1.12	2.18		
95974_at	Gbp1	7.12	14.05	3.18	8.29	(Briken et al., 1995; Olszewski et al., 2006)	(Briken et al., 1995; Olszewski et al., 2006; Ramsauer et al., 2007)
104597_at	Gbp2	12.19	12.57	13.17	11.51		
103202_at	Gbp3	4.11	6.52	6.81	18.84	(Olszewski et al., 2006)	(Chang et al., 1992)
104276_at	Glipr2	9.87	15.20	2.54	7.13		
93949_at	Gnb4	2.60	2.58	9.39	3.37		
92217_s_at	Gp49b	1.45	-3.31	3.03	11.25		
102311_at	Gp9	3.06	4.02	2.93	1.20		
98410_at	Iigp2	14.72	31.91	17.37	24.59		
103038_at	Guca1a	2.20	1.03	3.52	5.28		
93865_s_at	H2-T10	7.43	3.02	5.69	5.75		

101876_s_at	H2-T17	4.82	7.02	5.97	7.91	(Chang et al., 1992)
97173_f_at	H2-T23	3.92	3.20	2.66	2.79	(Chang et al., 1992)
98472_at	H2-T23	5.10	6.30	4.89	13.76	(Chang et al., 1992)
92766_at	Hand1	5.40	4.08	2.25	-2.97	
93328_at	Hdc	5.97	1.65	3.50	7.52	
97334_at	Hes6	7.42	6.64	1.12	1.48	
103833_at	Hipk2	14.54	1.76	3.72	8.89	
162169_r_at	Hist1h2bc	3.36	11.02	5.43	-5.70	
100946_at	Hsp70	8.85	2.33	5.89	4.22	
97409_at	Ifi1	3.99	4.35	3.01	9.14	
104750_at	Ifi47	8.05	1.19	6.41	8.17	(Gilly et al., 1996)
100981_at	Ifit1	28.72	20.61	18.82	28.88	
93956_at	Ifit3	40.61	36.93	37.45	95.85	
101788_f_at	Ifna1	5.56	16.92	9.52	6.27	(Harada et al., 1989)
101790_f_at	Ifna4	2.68	4.06	36.63	27.35	(Au et al., 1995)
101789_i_at	Ifna4	43.94	58.18	27.33	23.85	(Au et al., 1995)
101791_f_at	Ifna5	2.86	7.57	7.15	9.77	
102148_f_at	Ifna9	2.04	9.63	7.38	14.76	
101317_f_at	Ifnab	3.77	8.27	3.61	25.52	
94145_at	Ifnb	36.22	25.62	14.08	21.66	(Fujita et al., 1988; Harada et al., 1989; Miyamoto et al., 1988)
160933_at	Igtp	7.96	9.16	6.51	12.94	
103963_f_at	Ilgp-pending	7.95	14.49	4.63	18.80	
96764_at	Ilgp-pending	41.42	58.40	11.88	93.24	
103723_at	Il13ra1	2.99	2.93	5.96	3.61	
161023_at	Il15ra	3.56	3.65	3.14	3.30	
92489_at	Imap38	6.46	6.69	-1.27	8.92	
93942_at	Inpp1	109.95	13.45	78.95	17.22	
104669_at	Irf7	1.20	6.71	3.18	7.32	
161511_f_at	Isg15	9.77	5.09	4.64	11.73	(Pine et al., 1990)
98822_at	Isg15	16.90	12.16	14.18	22.45	(Pine et al., 1990)
103634_at	IRF-9	5.86	5.11	5.38	13.74	
103366_at	Arhgap9	1.97	5.29	12.26	3.09	
93878_at	Mllt10	1.53	1.86	-5.24	-5.11	
98417_at	Mx1	12.55	2.39	3.40	5.06	
102699_at	Mx2	20.41	13.65	21.97	8.12	
92881_at	Mylpf	3.02	4.12	-9.42	-5.48	
94156_at	Nppc	3.78	11.51	1.02	-1.39	
101486_at	Psmb10	4.10	3.99	3.35	4.13	
93085_at	LMP2	4.28	5.75	7.21	2.31	(Foss and Prydz, 1999)
161244_f_at	Pstpip1	1.05	2.02	3.32	3.60	(White et al., 1996)
92356_at	Ptpn8	2.27	9.42	6.46	13.38	
160514_at	Rp9h	3.13	4.59	1.13	-1.10	
97405_at	Rps6ka1	3.08	1.76	-3.79	-3.99	
162243_f_at	Rtkn	-1.46	-1.70	4.98	4.77	
96033_at	Sdc1	-1.25	3.34	3.47	6.03	
97997_at	Sfrp1	3.30	9.45	-1.02	5.01	
99504_at	Siat8c	-1.03	-3.51	3.23	10.56	
92471_i_at	Slfn2	3.91	4.24	7.65	8.68	
92472_f_at	Slfn2	5.02	6.39	6.73	3.44	
92832_at	Socs1	5.22	5.53	4.30	3.05	
98405_at	Spi6	2.64	4.44	6.66	6.31	
101465_at	Stat1	1.50	5.53	4.29	5.84	(Nguyen et al., 1997)
100365_at	Syt7	4.09	-4.53	4.49	3.00	
103035_at	Tap1	3.13	2.95	3.23	3.02	(White et al., 1996)
102873_at	Tap2	3.54	4.89	4.03	6.42	(Arons et al., 2001)
102906_at	Tgtp	39.34	30.24	31.77	52.16	
102282_g_a	Tnfrsf7	3.14	5.33	-1.26	-2.12	
102678_at	Trim21	3.47	5.02	4.10	5.24	

---

100475_at	Trim25	2.06	2.60	5.18	3.37
98030_at	Trim30	2.58	5.74	3.63	7.98
103066_at	Tyki	5.85	1.58	6.70	6.54
98597_at	Ubce8	3.39	5.88	7.60	1.19
100030_at	Upp	6.51	3.01	3.46	3.60
95024_at	Usp18	16.61	32.72	123.02	149.12
104177_at	Vig1	33.47	62.82	27.19	128.69

---

# DANKSAGUNG

Bei Herrn Dr. Gerhard Gross möchte ich mich für die Übernahme der akademischen Betreuung und Beurteilung dieser Doktorarbeit recht herzlich bedanken. Auch bei Herrn Prof. Dr. Dieter Jahn möchte ich mich für das Koreferat bedanken und dafür, dass er zusammen mit Herrn Dr. Gerhard Gross die Arbeit vor der Naturwissenschaftlichen Fakultät der technischen Universität Braunschweig vertritt. Herrn Prof. Dr. Ralf-Rainer Mendel danke ich für seine Bereitschaft zur Teilnahme an der Prüfungskommission.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Hansjörg Hauser für die Ermöglichung und Betreuung der Dissertation in seiner Arbeitsgruppe, am Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung (HZI) in Braunschweig. Seine stete Diskussionsbereitschaft und die Unterstützung bei der Auflösung von so manchen kniffligen Fragen, haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Zudem möchte ich mich ganz herzlich fürs Korrektur lesen bedanken.

Auch meiner Betreuerin Dr. Andrea Kröger möchte ich von ganzem Herzen Danken. Ich konnte von ihr so einige praktische Dinge des Laboralltags erlernen, denn wenn ich mal nicht weiter wusste hatte sie immer ein paar Tipps und Tricks parat. Natürlich möchte ich mich auch bei ihr für das Korrektur lesen dieser Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank geht auch an Martina Grashoff, die als gute Seele des Labors mit ihrem unerschöpflichen Fachwissen stets eine Antwort auf meine vielen Fragen hatte und immer für einen Spaß zu haben war. Es war mir eine Freude, mit ihr die unendlichen Fehlerquellen der Western Blots zu erforschen.

Außerdem möchte ich mich bei all meinen Kollegen der Abteilung Regulation und Differenzierung bedanken, ohne die die letzten drei Jahre ziemlich langweilig gewesen wären. Das gilt besonders für die „Mädels“ und neuerdings auch „Jungs“ aus dem Labor D2.44 und ganz besonders für Julia Pulverer, die immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Mein besonderer Dank geht auch an Michael Schaller, der seine Diplomarbeit im Rahmen dieser Doktorarbeit angefertigt hat und mir einige seiner Abbildungen zur Verfügung stellte.

Der größte Dank gilt meiner Familie und meinem Mann Christian ohne deren Liebe, Fürsorge und Unterstützung ich nie soweit gekommen wäre!